



THE UNIVERSITY *of* EDINBURGH

## Edinburgh Research Explorer

### Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos

**Citation for published version:**

Ferreira, M 2008, 'Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos', University of Lisbon.  
<<http://hdl.handle.net/10400.5/880>>

**Link:**

[Link to publication record in Edinburgh Research Explorer](#)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**General rights**

Copyright for the publications made accessible via the Edinburgh Research Explorer is retained by the author(s) and / or other copyright owners and it is a condition of accessing these publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

**Take down policy**

The University of Edinburgh has made every reasonable effort to ensure that Edinburgh Research Explorer content complies with UK legislation. If you believe that the public display of this file breaches copyright please contact [openaccess@ed.ac.uk](mailto:openaccess@ed.ac.uk) providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

PARASITOSEs CANINAS TRANSMITIDAS POR IXODÍDEOS

MARISA DA FONSECA FERREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

2008

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

PARASITOSE CANINAS TRANSMITIDAS POR IXODÍDEOS

MARISA DA FONSECA FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA

Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira  
Gomes Carneiro

2008

LISBOA

## **Agradecimentos**

À minha Orientadora, Professora Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio, Professora Associada da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), por toda a disponibilidade, orientação, instigação e transmissão de conhecimentos que permitiram a realização desta dissertação.

À minha Co-Orientadora, Dra. Joana Filipa Paiva de Ferreira Gomes Carneiro, Médica Veterinária a exercer medicina interna no Hospital Escolar da FMV, pelo apoio ao desenvolvimento deste tema, pela excelência de conhecimentos proporcionados na área da Clínica de Animais de Companhia e pelo esforço incansável em realçar a importância da relação Médico Veterinário – Proprietário.

Ao Professor Doutor António José Almeida Ferreira, director do Hospital Escolar da FMV, pela oportunidade de estágio concedida, bem como pela sabedoria transmitida.

A toda a equipa do Hospital Escolar da FMV, incluindo Médicos Veterinários, Auxiliares e Colegas estagiários, pela aprendizagem proporcionada e pelo ambiente de profissionalismo e camaradagem vivido.

Aos proprietários dos animais objecto deste estudo, pela amabilidade em colaborar com a resposta aos inquéritos realizados.

Aos familiares e amigos, pela paciência, apoio e incentivo demonstrados durante todo o período de estágio e execução desta dissertação.



# PARASITOSES CANINAS TRANSMITIDAS POR IXODÍDEOS

## Resumo

A presente dissertação refere-se ao período de Setembro de 2007 a Janeiro de 2008, durante o qual foi desenvolvida a componente prática do Estágio do Curso de Mestrado Integrado, no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária. Foi possível acompanhar uma casuística variada na área da Clínica de Animais de Companhia, dentro da qual foi escolhido o tema “Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos” para desenvolvimento.

Existem várias parasitoses, *sensu lato*, transmitidas por ixodídeos, que afectam a espécie canina, focando-se aquelas cujos agentes etiológicos incluem as espécies dos géneros: *Rickettsia*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Theileria*. Tipicamente, estas são caracterizadas por sinais clínicos não específicos como febre, letargia e anorexia. Podem também verificar-se, entre outros, perda de peso, mucosas pálidas, linfadenomegália, claudicação, icterícia, hepatoesplenomegália, edema subcutâneo, discoloração da urina, tendências hemorrágicas, manifestações oculares e neurológicas. A alteração laboratorial mais consistente é a trombocitopenia, sendo também frequente a anemia, hipoalbuminémia e hiperglobulinémia. O diagnóstico baseia-se em métodos serológicos, moleculares e/ou de microscopia óptica. O tratamento etiológico de eleição nas riquetsioses, erliquioses e anaplasmoses é realizado com doxiciclina ou minociclina. Nas babesioses e teilerioses utiliza-se imidocarb ou diminazeno. A forma primária de prevenção destas parasitoses assenta no controlo dos vectores, existindo imunoprofilaxia apenas contra *B. canis*. Adicionalmente, algumas espécies que infectam canídeos têm também potencial zoonótico.

No âmbito do tema escolhido, foi realizado um estudo, relativo a 28 cães, que evidenciaram contacto prévio com *Rickettsia* spp. (23/26), *B. canis* (14/24), *Ehrlichia* sp. (10/24) e *A. platys* (1/1), determinado através de imunofluorescência indirecta, reacção em cadeia da polimerase, ou microscopia óptica. A descrição geral da população, os aspectos epidemiológicos e clínicos e, a dificuldade de diagnóstico destas parasitoses, aquando da presença de doenças concomitantes, foram abordados.

Palavras-chave: *Rickettsia*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, cão, ixodídeo





# CANINE TICK-BORNE PARASITIC DISEASES

## Abstract

This thesis concerns the period between September 2007 and January 2008, during which took place the curricular training of the Integrated Master degree in Veterinary Medicine, at the Faculty of Veterinary Medicine Teaching Hospital. In this training, it was possible to follow a diverse caseload in the Small Animal's Medicine field, including cases regarding the selected subject "Canine tick-borne parasitic diseases".

There are many tick-borne parasitic diseases, *sensu latu*, which can affect dogs. The ones caused by species of the genera *Rickettsia*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Theileria*, are reviewed and discussed. Typically, these diseases are characterized by non-specific clinical signs like fever, lethargy and anorexia. Other signs may be apparent, including weight loss, pale mucous membranes, lymphadenomegaly, lameness, icterus, hepatosplenomegaly, subcutaneous oedema, urine discoloration, bleeding tendencies, ocular and neurological signs. The most consistent laboratory abnormality is thrombocytopenia, but anemia, hypoalbuminemia and hyperglobulinemia are also common. The diagnosis is based on serologic, molecular and/or optical microscopy methods. Specific treatment of choice includes doxycycline and minocycline, for rickettsiosis, ehrlichiosis and anaplasmosis. Imidocarb and diminazene are indicated for babesiosis and theileriosis. Vector control represents the primary mean of prevention for these diseases. At present, vaccination is available against *B. canis* only. In addition, it is important to highlight that some of these canine diseases also have a zoonotic feature.

On the subject of the selected theme, it was carried out a study involving 28 dogs, showing previous exposure to *Rickettsia* spp. (23/26), *B. canis* (14/24), *Ehrlichia* sp. (10/24) and *A. platys* (1/1), determined by indirect immunofluorescence, polimerase chain reaction or optical microscopy. The general description of the population, the epidemiological and clinical aspects and, the challenge in diagnosing canine tick-born parasitosis when concurrent diseases are present, were discussed.

Keywords: *Rickettsia*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, dog, tick



## Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de tabelas	ix
Índice de gráficos	ix
Índice de figuras	x
Índice de abreviaturas e de símbolos	xi
I. Introdução	1
1. Actividades desenvolvidas durante o estágio	2
2. Riquetsioses	5
2.1. Etiologia e epidemiologia	5
2.2. Fisiopatologia	7
2.3. Sinais clínicos	8
2.4. Diagnóstico	11
2.5. Terapêutica	14
2.6. Prognóstico	15
2.7. Prevenção	16
2.8. Implicações para a Saúde Pública	17
3. Babesioses e teilerioses	18
3.1. Etiologia e epidemiologia	18
3.2. Fisiopatologia	21
3.3. Sinais clínicos	24
3.4. Diagnóstico	25
3.5. Terapêutica	29
3.6. Prognóstico	31
3.7. Prevenção	31
3.8. Implicações para a Saúde Pública	33
4. Erliquioses e anaplasmoses	33
4.1. Etiologia e epidemiologia	33
4.2. Fisiopatologia	36
4.3. Sinais clínicos	39
4.4. Diagnóstico	42
4.5. Terapêutica	46
4.6. Prognóstico	48
4.7. Prevenção	49
4.8. Implicações para a Saúde Pública	50
5. Estudos de prevalência e perigos potenciais em co-infecções	51
6. Controlo de vectores	53
II. Estudo das parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos, observadas no Hospital Escolar da FMV – UTL, no período de Setembro de 2007 a Janeiro de 2008	57
1. Materiais e métodos	57
2. Resultados	59
2.1. Prevalências dos agentes etiológicos	59
2.2. Caracterização da população em estudo	59
2.3. Estudo clínico	64
3. Discussão	68
3.1. Prevalências dos agentes etiológicos	68
3.2. Caracterização da população em estudo	72
3.3. Estudo clínico	74
III. Conclusões	80

IV. Bibliografia	82
V. Anexos	93
1. Assistência a apresentações de temas clínicos durante o período de estágio curricular no Hospital Escolar da FMV	93
2. Apresentação realizada durante o período de estágio curricular: “Transfusões sanguíneas, terapia de componentes sanguíneos e soluções transportadoras de oxigênio” (Marisa Ferreira)	94
3. Inquérito realizado aos proprietários da população canina estudada	98

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Espécies de <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> observadas em cães, vetores e distribuição geográfica	21
Tabela 2 – Erliquioses e anaplasmoses caninas, espécies envolvidas, tropismo celular predominante, vetores e distribuição geográfica	34
Tabela 3 – Prevalência de vários agentes transmitidos por ixodídeos, observada em três estudos realizados na Sicília, Itália	53
Tabela 4 – Identificação, sexo, idade e positividade a agentes transmitidos por ixodídeos, na população estudada	58
Tabela 5 – Distribuição dos cães seropositivos por título de anticorpos	59
Tabela 6 – Caracterização da população estudada de acordo com a aptidão e a raça	60
Tabela 7 – Caracterização da pelagem dos animais estudados	60
Tabela 8 – Distribuição da população estudada por distrito e concelho de residência	61
Tabela 9 – Características do acesso a espaços públicos dos cães estudados (n=25)	61
Tabela 10 – Distribuição de resultados do inquérito relativos a controlo de vetores, antes e após o diagnóstico	63
Tabela 11 – Resultados dos hemogramas de 25 animais, obtidos antes da pesquisa dos agentes etiológicos	65
Tabela 12 – Alterações dos parâmetros bioquímicos no soro dos animais estudados	66
Tabela 13 – Presença de doenças concomitantes nos animais submetidos a pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos	67

## Índice de gráficos

Gráfico 1 – Frequência relativa de positividade por agente etiológico e por sexo em 23 soros de cães analisados por IFI	59
Gráfico 2 – Resultados do tipo de proveniência dos cães em estudo	61
Gráfico 3 – Frequência absoluta e frequência relativa dos sinais clínicos observados nos 28 cães estudados	64

## Índice de figuras

Figura 1 – Aspecto de mielografia, evidenciando hérnia discal cervical em cão _____	2
Figura 2 – Dermatite grave generalizada em quelônio _____	2
Figura 3 – Síndrome de Horner em gato _____	2
Figura 4 – Sarcoma de Sticker em cadela, com localização vulvar _____	3
Figura 5 – Pustulose eosinofílica estéril em cadela _____	3
Figura 6 – Prolapso cloacal em osga _____	3
Figura 7 – Prolapso da glândula da membrana nictitante em cão _____	4
Figura 8 – Abscesso supra-orbitário em canário _____	4
Figura 9 – Aspecto da técnica de avanço da tuberosidade tibial em cão _____	4
Figura 10 – Necrose do plano nasal em cão com riquetsiose por <i>R. rickettsii</i> _____	9
Figura 11 – Petéquias na mucosa oral em cão com riquetsiose por <i>R. rickettsii</i> _____	9
Figura 12 – Imagem de imunofluorescência indirecta positiva para anticorpos anti- <i>R. conorii</i> _____	13
Figura 13 – Eritrócitos parasitados por <i>B. vogeli</i> , em várias formas morfológicas _____	19
Figura 14 – Eritrócito evidenciando merozoítos de <i>B. canis</i> . Coloração por Giemsa _____	19
Figura 15 – Eritrócitos parasitados por <i>B. gibsoni</i> _____	20
Figura 16 – Eritrócitos parasitados por <i>T. annae</i> . Coloração por Giemsa _____	20
Figura 17 – Icterícia em cão com babesiose _____	29
Figura 18 – Hemorragia cerebral disseminada em cão com babesiose cerebral por <i>B. rossi</i> _____	29
Figura 19 – Mórula de <i>E. canis</i> em monócito. Coloração por Giemsa _____	35
Figura 20 – Mórula de <i>A. phagocytophilum</i> em neutrófilo. Coloração por Giemsa _____	35
Figura 21 – Mórula de <i>A. platys</i> em plaqueta. Coloração por Giemsa _____	35
Figura 22 – Petéquias no abdómen ventral em cão com erliquiose monocitotrófica canina (EMC) _____	40
Figura 23 – Epistaxis em cão com EMC _____	40
Figura 24 – Uveíte anterior unilateral crónica em cão com EMC _____	41
Figura 25 – Uveíte e glaucoma secundário em cão com EMC _____	41
Figura 26 – Exame do fundo do olho. Hemorragia e descolamento exsudativo da retina _____	41

## Índice de abreviaturas e de símbolos

>	–	Maior
$\geq$	–	Maior ou igual
<	–	Menor
$\leq$	–	Menor ou igual
%	–	Porcentagem
°C	–	Graus Celsius
$\mu\text{L}$	–	Microlitro
$\mu\text{m}$	–	Micrómetro
AAS	–	Amilóide A Sérica
Ac	–	Anticorpo
ADN	–	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	–	Antigénio
AGC	–	Anaplasmosse Granulocitotrópica Canina
AHIM	–	Anemia Hemolítica Imunomediada
ALT	–	Alanina aminotransferase
AST	–	Aspartato aminotransferase
ATC	–	Anaplasmosse Trombocitotrópica Canina
BID	–	A cada doze horas
CHCM	–	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID	–	Coagulação Intravascular Disseminada
CK	–	Creatina quinase
CRP	–	Proteína C Reactiva
DAPP	–	Dermatite Alérgica à Picada de Pulga
DDO	–	Doença de Declaração Obrigatória
dL	–	Decilitro
EGC	–	Erliquiose Granulocitotrópica Canina
ELISA	–	<i>Enzyme-Linked Immunosorbant Assay</i>
EMC	–	Erliquiose Monocitotrópica Canina
EV	–	Endovenosa
FAS	–	Fosfatase Alcalina Sérica
fL	–	Fentolitro
g	–	Gramma
GGT	–	Gama Glutamyl Transpeptidase

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HT – Hematócrito  
IFD – Imunofluorescência Directa  
IFI – Imunofluorescência Indirecta  
IFN- $\gamma$  – Interferão- $\gamma$   
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
IM – Intramuscular  
IRA – Insuficiência Renal Aguda  
kg – Quilograma  
mg – Miligrama  
mmol - Milimol  
L – Litro  
LCR – Líquido Céfalo-Raquidiano  
LIV – Vírus da *Louping Ill*  
MHC-II – Classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade  
PCR – Reacção em cadeia da polimerase  
PFA – Proteína de Fase Aguda  
PDFs – Produtos de Degradação da Fibrina/Fibrinogénio  
pg – Picograma  
PIO – Pressão Intra-ocular  
PO – Por via oral  
QID – A cada seis horas  
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
SC – Subcutânea  
SID – A cada vinte e quatro horas  
SNC – Sistema Nervoso Central  
TBEV – Vírus da encefalite transmitido por ixodídeos  
TCA – Tempo de Coagulação Activada  
TID – A cada oito horas  
TP – Tempo de Protrombina  
TT – Tempo de Trombina  
TTA – Avanço da Tuberosidade Tibial  
TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Activada  
VCM – Volume Corpuscular Médio



# I. Introdução

Parasitismo, *sensu lato*, define uma interacção biológica entre dois organismos, na qual um deles beneficia em detrimento do outro. Neste contexto, o parasita pode ser representado por qualquer agente etiológico, nomeadamente por um protozoário, uma bactéria, um vírus, entre outros.

As parasitoses transmitidas por ixodídeos são consideradas cada vez mais um problema emergente em climas temperados e ambientes urbanos. Esta situação deve-se em parte às alterações climáticas, à utilização dos solos para actividades de agricultura e lazer e à ecologia dos ixodídeos e dos hospedeiros reservatórios, nomeadamente à sua movimentação para áreas previamente não endémicas. Adicionalmente, tem-se assistido a uma rápida evolução das técnicas de diagnóstico molecular, permitindo uma detecção mais exacta e sensível dos microorganismos (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001; Genchi, 2006).

Os canídeos domésticos são susceptíveis a infecção por vários agentes transmitidos por ixodídeos, nomeadamente: protozoários – *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp.; bactérias – *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Borrelia* spp., *Mycoplasma haemocanis*, *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*; e vírus – vírus da encefalite transmitida por ixodídeos (TBEV) e vírus da *Louping Ill* (LIV), ambos do género *Flavivirus* (Shaw et al., 2001).

As babesioses, as erliquioses e as riquetsioses caninas são doenças infecciosas causadas por agentes intracelulares obrigatórios, e são as doenças transmitidas por ixodídeos mais frequentemente diagnosticadas no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV). A sua importância deve-se não só ao carácter mais ou menos patogénico no que concerne à espécie canina, mas também ao papel potencialmente zoonótico de algumas destas doenças.

A presente dissertação traduz o culminar do Estágio do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, cuja componente prática assumiu a forma de estágio de natureza profissional na área da Clínica de Animais de Companhia. Assim, será feita uma descrição resumida das actividades desenvolvidas durante o estágio, seguida de uma revisão bibliográfica do tema proposto. Na segunda secção proceder-se-á ao estudo de um conjunto de casos observados no decurso do estágio, em que se verificou contacto prévio com os agentes etiológicos das doenças descritas. Por fim, serão salientadas as conclusões obtidas.

## 1. Actividades desenvolvidas durante o estágio

A componente prática do estágio curricular foi desenvolvida no Hospital Escolar da FMV, entre o dia 24 de Setembro de 2007 e o dia 25 de Janeiro de 2008, com uma carga horária total de 776 horas.

As actividades consistiram principalmente na observação e participação nos serviços de Medicina Interna, Cirurgia, Imagiologia e Internamento, em turnos rotativos. Ao todo foram observados 402 animais, a maioria (67%) correspondendo à espécie canina, e o restante à espécie felina (30%) e aos novos animais de companhia (3%) como aves, pequenos mamíferos e répteis.

No serviço de Medicina Interna foi possível iniciar consultas externas, realizando a história pregressa e o exame físico. De seguida, eram discutidos com o médico veterinário assistente os diagnósticos diferenciais, os exames complementares de diagnóstico e a terapêutica a instituir. Para além de consultas de primeira opinião, assistiu-se também a consultas de referência de dermatologia, oftalmologia, cardiologia, ortopedia e reprodução.

Excluindo as consultas de primovacinação e vacinação, observaram-se com maior frequência casos de neoplasias, insuficiência renal, gastroenterites, fracturas ósseas, leishmaniose, parasitoses transmitidas por ixodídeos, hérnias discais (Figura 1), derrames pleurais, displasia coxofemoral, otites e dermatites (Figura 2).

**Figura 1** – Aspecto de mielografia, evidenciando hérnia discal cervical em cão



**Figura 2** – Dermatite grave generalizada em quelónio



**Figura 3** – Síndrome de Horner em gato



Entre os casos mais interessantes e menos frequentes salientam-se os seguintes: priapismo em gato, hipoadrenocorticism primário em cadela, síndrome de Horner (Figura 3) em gato, sarcoma de Sticker em cadela (Figura 4), leptospirose em cachorro, pustulose eosinofílica estéril em cadela (Figura 5), megaesófago em cão, estenose aórtica em cão complicada com hemoptise e edema pulmonar, neoplasia quística da tiróide associada a processo inflamatório

piogranulomatoso em gata, prolapso cloacal em osga (Figura 6), uveíte anterior bilateral secundária a piómetra em cadela, prolapso da glândula da membrana nictitante em cachorro (Figura 7), avulsão parcial traumática do plexo braquial em cão, edema vulvar secundário a quisto ovárico em cadela, reacção adversa à vacinação em cachorro, tumor pediculado do tipo mixoma no ventrículo direito do coração de um cão, fractura patológica secundária a hipocalcémia em psitacídeo, e hifema unilateral secundário a insuficiência renal hipertensiva em gato.

**Figura 4** – Sarcoma de Sticker em cadela, com localização vulvar



**Figura 5** – Pustulose eosinofílica estéril em cadela



**Figura 6** – Prolapso cloacal em osga



Em Cirurgia as tarefas consistiram na preparação dos pacientes, auxílio do cirurgião, monitorização da anestesia e do pós-operatório. Foram observados vários tipos de cirurgias dentro das áreas de tecidos moles, ortopedia e neurocirurgia. A participação em consultas de seguimento pós-operatório traduziu-se por remoção de pontos de sutura, aplicação de vários tipos de pensos e fisioterapia.

As cirurgias observadas com maior frequência consistiram em orquiectomias electivas em gatos, ovariectomias electivas e mastectomias secundárias a neoplasias mamárias, em cadelas e gatas. Cirurgias menos comuns incluíram: herniorrafia de hérnia perineal em dois cães; drenagem cirúrgica de abscessos supra e infra-orbitários em dois canários (Figura 8); execução da técnica de avanço da tuberosidade tibial (TTA) para resolução de ruptura de ligamento cruzado cranial em cão (Figura 9); uma amputação por desarticulação escápulo-umeral devido a neoplasia óssea maligna em cão, uma *ventral slot* e uma hemilaminectomia para resolução de hérnia discal cervical e toracolombar, respectivamente, em dois cães.

No serviço de Imagiologia houve a oportunidade de observar e participar em vários tipos de diagnóstico imagiológico como radiologia, ultrasonografia e tomografia axial computadorizada. Em radiologia foram praticados o posicionamento animal, a selecção de constantes

radiográficas e a revelação de películas. Na ultrasonografia foi possível praticar a colocação e movimentação da sonda no animal. Acresce ainda a observação de um exame de ressonância magnética realizado no centro de Ressonância Magnética de Caselas, num gato com sintomatologia neurológica, no qual se verificou uma área de mielomalácia, secundária a uma malformação congénita do processo odontóide do eixo.

**Figura 7** – Prolapso da glândula da membrana nictitante em cão



**Figura 8** – Abscesso supra-orbitário em canário



**Figura 9** – Aspecto da técnica de avanço da tuberosidade tibial em cão



No serviço de Internamento as tarefas consistiram em turnos de vinte e quatro horas cada, nos quais era realizado todo o maneio dos animais, desde a monitorização, à administração de medicação, à alimentação, aos cuidados de higiene e ao exercício/passeio no exterior.

Ao longo de todo o estágio houve oportunidade de participação directa em actividades de triagem hospitalar, preparação e administração de fármacos, recolha, preparação e envio de amostras para análise laboratorial ou para observação local ao microscópio, realização de testes rápidos de diagnóstico, recepção e maneio de urgências, entre outras.

Adicionalmente, foram realizadas discussões semanais de carácter didáctico com a Co-Orientadora Dra. Joana Gomes Carneiro, sobre vários temas na área Clínica como insuficiência renal, insuficiência hepática, exame neurológico, doenças endócrinas, doenças infecciosas, doenças cardiovasculares, gastroenterologia e oftalmologia.

É ainda de salientar a assistência a sessões semanais organizadas pelo Mestre Nuno Félix, a Dra. Ana Mafalda Lourenço e o Dr. Gonçalo Vicente, as quais consistiram na apresentação de temas pelos alunos estagiários do Hospital Escolar, bem como por médicos veterinários convidados (Anexo 1). A participação activa nestas sessões foi realizada com o tema “Transfusões sanguíneas, terapia de componentes sanguíneos e soluções transportadoras de oxigénio” (Anexo 2).

## 2. Riquetsioses

### 2.1. Etiologia e epidemiologia

Os organismos do género *Rickettsia* são bactérias Gram negativas pleomórficas, intracelulares obrigatórias, com distribuição cosmopolita, pertencentes à ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae* (Parola, Paddock & Raoult, 2005). Estes cocobacilos podem infectar vários mamíferos como humanos, canídeos, felídeos e roedores. A maioria das espécies conhecidas está distribuída em dois grandes grupos: o grupo exantemático (*spotted fever group*), incluindo por exemplo as espécies *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. japonica*, *R. felis* e *R. akari*; e o grupo do tifo (*typhus group*), incluindo por exemplo as espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*. As espécies do primeiro grupo são transmitidas por ixodídeos, pulgas (no caso de *R. felis*) ou ácaros (no caso de *R. akari*), enquanto que as do segundo grupo são usualmente transmitidas por pulgas e piolhos (Greene, 2006).

A distribuição das doenças transmitidas por ixodídeos é, geralmente, o reflexo da distribuição dos ixodídeos que as transmitem. Contudo, tal começa a alterar-se, devido à movimentação de canídeos infectados para áreas não endémicas, aumentando grandemente a distribuição geográfica destas doenças (Varela, 2003). Existem várias espécies que podem infectar canídeos, mas a maioria é considerada não patogénica, com excepção de *R. rickettsii*, agente da febre das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain spotted fever*). Todavia, o papel das riquetsias não patogénicas em indivíduos imunodeprimidos ainda não foi clarificado (Greene, 2006).

Apesar da espécie *R. conorii* ser geralmente reconhecida como não patogénica em canídeos, foi recentemente associada a infecção clínica aguda natural, na Sicília, através de PCR ( reacção em cadeia da polimerase), sequenciação de ADN e seroconversão imunológica, verificada por imunofluorescência indirecta (IFI). Até então, apenas tinha sido detectado ADN desta riquetsia no sangue de cães europeus, mas sem evidência de doença clínica. Em infecções experimentais, os únicos sinais observados foram linfadenopatia regional e dor, eritema e edema no local de inoculação (Solano-Gallego et al., 2006b). Adicionalmente, foi também verificada seroconversão em três canídeos sintomáticos em Israel, suportando o diagnóstico de infecção aguda por este agente. Contudo, não foi referida a existência de infecção concomitante por outros agentes infecciosos que, existindo, poderia contribuir para os sinais clínicos observados (Baneth, Breitschwerdt, Hegarty, Pappalardo & Ryan, 1998).

A distribuição desta espécie verifica-se na área mediterrânica da Europa, bem como em muitas zonas do continente Africano e Asiático e o seu vector primário e hospedeiro

reservatório é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, sendo os canídeos os hospedeiros primários do vector (World Health Organization [WHO], 2004). É considerado que ocorre infecção subclínica e riquetsiemia transiente em cães e roedores, tendo estes o papel de portadores e reservatórios ocasionais do agente.

A detecção de anticorpos (Ac) anti-*R. conorii* em canídeos tem sido utilizada em estudos epidemiológicos devido aos níveis elevados de exposição ao vector e à resposta imunitária humoral intensa. Os dados de seroprevalência podem ser utilizados como indicadores sensíveis do risco de infecção nos humanos. Em Itália, a seroprevalência varia entre 30-80% e os títulos mais elevados foram verificados em cães com idade superior a dois anos (Genchi, 2006). Em Portugal, a seroprevalência variou entre 38,5% numa população de 400 cães com cuidados médicos na região do Algarve (Alexandre, 2005), a 85,6% numa população de 104 cães do canil municipal de Setúbal (Bacellar, Dawson, Silveira & Filipe, 1995). Em Espanha verificou-se que os animais com seroprevalências significativamente mais elevadas pertenciam aos grupos de áreas rurais, utilização para guarda de rebanhos e propriedades, e com elevada carga de ixodídeos. A frequência de cães seropositivos aumentou nos meses de Verão, o que coincidiu com o período de maior actividade do vector (WHO, 2004).

Pode ser necessária a ocorrência de uma deficiência imunológica ou metabólica para que haja desenvolvimento da doença em várias raças caninas, após infecção com *R. conorii*. Contudo, existem outras explicações plausíveis para a discrepância entre elevadas taxas de seroprevalência em animais saudáveis, que sugerem grande exposição ao agente, e a ausência de notificação da doença clínica. Por exemplo, a natureza aguda, não específica e potencialmente autolimitante da infecção, combinada com um baixo índice de suspeita e com a falta de técnicas específicas de diagnóstico, podem ter contribuído para o impedimento da associação prévia entre os sinais clínicos e a infecção (Solano-Gallego et al., 2006b). A possibilidade de ocorrência de doença clínica por esta espécie foi recentemente reforçada, pela associação entre seropositividade e anemia, num estudo seroepidemiológico em Espanha. Torna-se assim necessária a recolha adicional de dados que evidenciem até que ponto *R. conorii* causa doença clínica em canídeos (Solano-Gallego, Llull, Osso, Hegarty & Breitschwerd, 2006a).

A ocorrência de *Rickettsia rickettsii* está descrita no continente americano. A sua distribuição relaciona-se com a distribuição dos ixodídeos que servem como hospedeiros invertebrados naturais, reservatórios e vectores: *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni*, *Amblyomma cajennense* e *R. sanguineus*. A transmissão transovárica é a principal forma de manutenção desta riquetsia na natureza. Adicionalmente, também se verifica transmissão transtadial e venérea nos ixodídeos (Greene, 2006), bem como transmissão horizontal ao se alimentarem

em pequenos roedores silváticos, durante os estádios de larva e ninfa. Dentro da população global de ixodídeos, a prevalência da infecção é menor que 2%, sugerindo que a maioria dos hospedeiros de ixodídeos adultos, como os canídeos, raramente desenvolvam riquetsiemia de duração e magnitude suficiente, que permita a infecção subsequente de um grande número de ixodídeos. A infecção clínica pode ocorrer em canídeos e humanos e verifica-se nos meses mais quentes do ano (Março a Outubro), em que os ixodídeos são mais activos. Contudo, esta sazonalidade não é tão marcada em regiões de baixa latitude (Shaw & Day, 2005). É de notar que esta bactéria nunca foi isolada em humanos, canídeos ou ixodídeos na Europa, tendo sido apenas diagnosticada a doença em indivíduos que regressaram dos Estados Unidos da América (EUA) (Genchi, 2006).

## **2.2. Fisiopatologia**

A transmissão das bactérias ocorre através da saliva do ixodídeo, inoculada aquando da refeição sanguínea. Foram descritos numerosos componentes incluindo vasodilatadores, factores anticoagulantes e imunossuppressores, que facilitam a sua alimentação e a entrada dos agentes infecciosos na circulação do hospedeiro vertebrado. A caracterização destes factores é de crescente importância, devido ao potencial de utilização em vacinas (Varela, 2003).

O agente também pode ser disseminado através de tecidos, hemolinfa ou fezes de ixodídeos que entrem em contacto com soluções de continuidade da pele. O microorganismo é estável em tecidos ou sangue de ixodídeo à temperatura ambiente, mantendo-se viável por um ano (Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2005b).

Para que ocorra infecção, é necessário que a fixação do ixodídeo persista por 5-20 horas, pois o processo de alimentação estimula a replicação das riquetsias nas glândulas salivares. Após entrada no sistema circulatório, a bactéria replica-se nas células endoteliais de pequenos vasos e capilares sanguíneos, lesionando directamente estas células e resultando em vasculite. Ocorre activação plaquetária e dos sistemas de coagulação e fibrinolítico, com diminuição dos níveis de antitrombina III e plasminogénio e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio (PDFs). O consumo de factores de coagulação não é geralmente suficiente para resultar em hipofibrinogénemia ou coagulação intravascular disseminada (CID) (Greene, 2006).

A vasculite induz o consumo plaquetário, levando à diminuição do número de plaquetas no sangue, mas a patogénese da trombocitopénia associada às riquetsioses pode ser multifactorial (Gasser, Birkenheuer, & Breitschwerdt, 2001). Por exemplo, a detecção de níveis elevados de Ac anti-plaquetários em cães, experimental e naturalmente infectados, sugere a existência de

destruição plaquetária imunomediada. A vasculite necrotizante progressiva e o aumento da permeabilidade vascular levam a passagem de sangue para o espaço intersticial, originando edema, hemorragia, hipotensão e choque. Os órgãos com circulação endarterial como a pele, o cérebro, o coração e os rins, são os mais afectados (Greene, 2006). Em casos severos, a diminuição da perfusão dos tecidos, devido à hipotensão, pode resultar em insuficiência renal aguda (IRA) e a inflamação do miocárdio pode ser fatal (Varela, 2003). Adicionalmente, a infecção fulminante pode resultar em colapso vascular periférico e morte na primeira semana de infecção, antes de ocorrerem as lesões trombóticas e proliferativas. O desenvolvimento de sinais neurológicos e morte pode estar relacionado com a depressão cardio-respiratória, devido ao edema que envolve os centros medulares (Greene, 2006). As alterações a nível ocular reflectem a presença de infiltrados de células inflamatórias e hemorragia na retina (Varela, 2003).

### **2.3. Sinais clínicos**

Embora a severidade da doença difira entre as várias espécies, os achados clínicos e laboratoriais são marcadamente semelhantes entre as riquetsioses existentes. Todas as riquetsioses do grupo exantemático são caracterizadas por doença aguda de progressão rápida, geralmente acompanhada de febre e trombocitopenia (Breitschwerdt, 2007b). Não existe evidência que suporte uma infecção vascular crónica ou indução de doença crónica, pois há desenvolvimento de imunidade protectora, o que explica a manifestação da doença por *R. rickettsii* em animais com idade igual ou inferior a três anos (Varela, 2003). Todavia, num estudo retrospectivo em 30 cães naturalmente infectados por *R. rickettsii*, 50% dos animais tinha mais de sete anos de idade (Gasser et al., 2001).

A susceptibilidade canina a *R. rickettsii* foi descrita pela primeira vez por Badger em 1933. Trata-se de uma doença muito mais comum do que anteriormente reconhecido e, quando não tratada, pode resultar em morbilidade severa e mortalidade, cuja taxa foi avaliada em 4% (Mikszewski & Vite, 2005). Contudo, os casos subclínicos e ligeiros são mais comuns e os animais não tratados recuperam, geralmente, em menos de duas semanas (CFSPH, 2005b).

A severidade da doença está relacionada com a quantidade de inóculo e com a raça. Foi relatada doença severa nas raças Pastor Alemão (Greene, 2006) e Husky Siberiano, enquanto que na raça Deerhound Escocês foi verificado um elevado título de anticorpos, sem evidência prévia de doença associada (Breitschwerdt, 2007b). Verificou-se também que os cães da raça Springer Spaniel Inglês com deficiência hereditária em fosfofrutoquinase desenvolveram um



quadro mais severo da doença e eram mais susceptíveis a necrose cutânea, tal como os animais cujo tratamento foi tardio (Greene, 2006).

É possível que os cães machos tenham um risco mais elevado de infecção com *R. rickettsii* e *R. conorii*, estando também mais predispostos a serem seropositivos a *R. conorii* (Solano-Gallego et al., 2006b). Em cerca de 17-40% dos casos verifica-se a presença de ixodídeos durante a consulta ou existe história recente de exposição a ixodídeos (Gasser et al., 2001; Mikszewski & Vite, 2005).

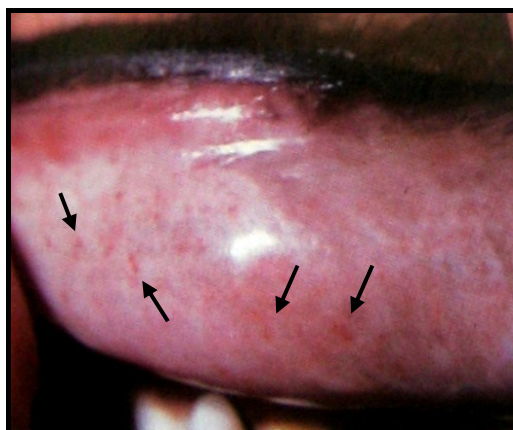
A febre, um dos primeiros e mais consistentes sinais, pode ocorrer 2-3 dias após a fixação do ixodídeo. O período de incubação de *R. rickettsii* é de 2-14 dias e a duração da doença é geralmente curta, compreendendo duas semanas ou menos (Varela, 2003). À apresentação do animal são também típicos os sinais de anorexia e depressão ou letargia. Adicionalmente verifica-se perda de peso, sinais oculares, linfadenomegália periférica, edema subcutâneo e hiperémia de várias extremidades, taquicardia, taquipneia, dispneia, icterícia, hepatomegália, mialgia, artralgia, dificuldade em se levantar, edema e rigidez articulares, alterações neurológicas, vômito, diarreia, dor abdominal, corrimento nasal mucopurulento, tosse, petéquias, equimoses e necrose cutânea (Figura 10).

As hemorragias petequiais (Figura 11) e equimóticas não são frequentes nos canídeos (Shaw & Day, 2005), mas quando ocorrem são mais comuns nos casos agudos e na mucosa oral, ocular e genital, em vez de na pele. Na mucosa oral foram também observadas vesículas discretas e máculas eritematosas focais (Greene, 2006). Pode ainda notar-se epistaxis, melena e hematúria, nos animais severamente afectados. As tendências hemorrágicas são mais frequentes quando o diagnóstico e o tratamento são realizados mais de cinco dias após o início dos sinais clínicos, devendo-se geralmente à vasculite e não à trombocitopénia (CFSPH, 2005b, Breitschwerdt, 2007b).

**Figura 10** – Necrose do plano nasal em cão com riquetsiose por *R. rickettsii* (Shaw & Day, 2005)



**Figura 11** – Petéquias na mucosa oral em cão com riquetsiose por *R. rickettsii* (Greene, 2006)



Em machos, é frequente observar edema do escroto, bem como dor, hiperémia e hemorragia do epidídimo (Breitschwerdt, 2007b). Estes sinais estão muitas vezes associados a uma locomoção relutante e rígida, como resultado da inflamação articular, muscular e meníngea.

As lesões oculares são comuns e tendem a ser bilaterais, podendo contudo ser assimétricas. Os sinais mais frequentes são hemorragias. Pode verificar-se corrimento mucopurulento, conjuntivite, congestão ou hemorragia conjuntival e dos vasos episclerais, uveíte anterior, hifema, hemorragias e edema da retina, exsudados coriorretinais e descolamento da retina (CFSPH, 2005b).

Os sinais neurológicos são observados em cerca de 43% dos casos e os animais com elevado título de Ac à apresentação podem ter uma incidência superior de sintomatologia neurológica severa, anomalias da coagulação e necrose cutânea. A disfunção vestibular pode ser a anomalia neurológica específica mais comum (Gasser et al., 2001; Mikszewski & Vite, 2005), ocorrendo na fase inicial da doença e frequentemente como estímulo iatrotópico. Outros sinais incluem estupor, ataxia, paraparésia ou tetraparésia, hiperestesia generalizada ou localizada, tremores de intenção da cabeça e convulsões.

Em estadios terminais da doença podem ocorrer convulsões, défices da função dos nervos cranianos, miocardite, coma, colapso cardiovascular, oligúria e choque. Em casos severos verificou-se necrose das extremidades, lesões necrotizantes na pele e CID. Pensa-se que a CID fulminante apenas ocorre em casos complicados por sepsis (Gasser et al., 2001).

Devido à escassez de informação no que concerne à apresentação clínica da riquetsiose por *R. conorii* e à potencial importância que este agente tem em Portugal, serão descritos de seguida os sinais clínicos observados na Sicília, em três Yorkshire Terriers machos não relacionados, cuja doença aguda foi confirmada. Os casos ocorreram entre os meses de Maio e Setembro, a idade média foi de 4,3 anos e todos os canídeos tinham história recente de exposição a ixodídeos. Os sinais clínicos incluíram febre (40,1-41 °C) (n=3), anorexia (n=3), letargia (n=3), linfadenomegália periférica (n=2), claudicação intermitente com dor articular (n=1), locomoção rígida e cifose (n=1), blefarite (n=1), conjuntivite (n=1), taquicardia (n=1), ptialismo (n=1), vômito intermitente com dor abdominal e desidratação (n=1). É de salientar que um destes animais revelou serologia positiva para *Anaplasma phagocytophilum*, podendo haver sobreposição de sinais clínicos (Solano-Gallego et al., 2006b).

## 2.4. Diagnóstico

A variação marcada na apresentação clínica do animal leva à possibilidade de vários diagnósticos diferenciais, dentro das doenças infecciosas e não infecciosas. Adicionalmente, a co-infecção com outros agentes etiológicos transmitidos por ixodídeos, deve ser considerada em animais com quadros severos ou atípicos.

A alteração hematológica mais consistente é a trombocitopénia, geralmente ligeira, com observação frequente de megatrombócitos. Num estudo retrospectivo, 83% dos animais infectados revelaram trombocitopénia e 40% tinham trombocitopénia severa, inferior a  $75 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  (Gasser et al., 2001). Normalmente, ocorre leucopénia ligeira nas primeiras 24-48 horas, seguida de leucocitose progressiva, aumentando proporcionalmente à severidade da doença. Pode verificar-se ainda neutrofilia moderada com desvio à esquerda, granulação tóxica de neutrófilos, metamielócitos (neutrófilos imaturos), eosinopénia, linfopénia, monocitose, e anemia normocítica e normocrómica ligeira a moderada (Greene, 2006; Breitschwerdt, 2007b).

A única anomalia de coagulação observada pode ser um ligeiro prolongamento do tempo de coagulação activada (TCA), embora também se verifique prolongamento do tempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) e aumento dos PDFs (Gasser et al., 2001). Geralmente verifica-se hiperfibrinogénemia nos casos ligeiros a moderados, como resultado da reacção à fase aguda. Contudo, o fibrinogénio pode estar diminuído em casos severos devido a um rápido consumo, secundário à vasculite.

As anomalias bioquímicas podem incluir um ligeiro aumento da glicémia e das enzimas hepáticas fosfatase alcalina sérica (FAS), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A hipercolesterolemia tem sido uma das alterações mais consistentes nos animais afectados. Frequentemente verifica-se hipoalbuminémia, devendo-se provavelmente à extravasão associada a lesão endotelial vascular generalizada. A hiponatremia, hipoclorémia e acidose metabólica são achados variáveis. Pode verificar-se uma hipocalcémia artefactual, que normaliza após a correcção da hipoalbuminémia. A ureia sérica pode aumentar em estadios terminais da doença, devido a oligúria e insuficiência renal (Greene, 2006).

Pode verificar-se proteinúria e hematuria, como resultado de alterações na coagulação, ou de lesão glomerular e tubular. Em alguns animais ocorre bilirrubinúria e hiperbilirrubinémia, geralmente ligeiras, bem como aumento da creatina quinase (CK), ligeiro a moderado. A análise do líquido céfalo-raquidiano (LCR) é geralmente normal, podendo contudo observar-se ligeiro aumento da fracção proteica e celular (neutrófilos ou monócitos), sinais de meningite supurativa. O líquido sinovial em animais com poliartrite demonstra alterações

inflamatórias, com aumento predominante de neutrófilos, revelando poliartrite supurativa. Radiografias torácicas podem evidenciar um padrão intersticial difuso, especialmente em cães com dispneia e tosse (Greene, 2006). No traçado electrocardiográfico pode verificar-se alterações da condução relacionadas com miocardite, incluindo disfunção do nodo sinoatrial, depressão do segmento ST e da onda T e contracções ventriculares prematuras (Shaw & Day, 2005).

As modificações hematológicas e bioquímicas descritas na riquetsiose canina por *R. conorii* incluíram trombocitopénia, anemia, hipoproteinémia, hipoalbuminémia e neutrofilia com ou sem desvio à esquerda. Uma semana após o início do tratamento verificou-se neutrofilia, linfocitose, hipoalbuminémia, hiperproteinémia com hiperglobulinémia, aumento da ureia e da actividade das enzimas hepáticas ALT e gama glutamil transpeptidase (GGT), com ausência de sinais clínicos (Solano-Gallego et al., 2006b).

A confirmação do diagnóstico requer serologia, amplificação de ADN por PCR ou pesquisa de antígenos (Ag) em biópsias tecidulares ou *post mortem* por imunofluorescência directa (IFD). A cultura destas bactérias apenas é realizada em actividades de investigação, pois a sua utilização como método de diagnóstico é impraticável, devido ao longo período necessário para o isolamento (Varela, 2003).

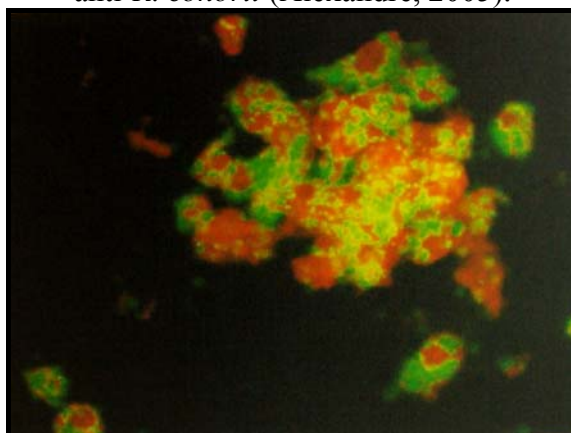
O diagnóstico por PCR tornou possível a detecção de ADN, a partir de um pequeno número de microorganismos, no sangue total ou em amostras de tecidos. É de salientar que a persistência de ADN de riquetsias não viáveis pode levar a resultados positivos por longos períodos de tempo, após o tratamento (Greene, 2006). Adicionalmente, os *primers* utilizados para amplificar estes agentes abrangem várias espécies de riquetsias, só sendo possível estabelecer a verdadeira espécie implicada através de sequenciação de ADN (Torina & Caracappa, 2006).

A serologia é o método primário de confirmação da doença na prática clínica. Os métodos mais adequados para a testagem de *R. rickettsii* no soro canino parecem ser a IFI (Figura 12), o método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*) e a aglutinação em látex. Os dois primeiros métodos têm a vantagem de necessitar apenas de pequenas amostras de soro e reagentes, revelando elevada sensibilidade e diferenciando os Ac em imunoglobulinas (Ig)G ou IgM (Greene, 2006). A análise semi-quantitativa de IgG anti-*R. rickettsii*, baseada em ELISA, permite um resultado rápido no local de consulta (Mikszewski & Vite, 2005).

O diagnóstico é confirmado quando o título de IgG aumenta quatro ou mais vezes, entre a fase aguda e a fase de convalescença, três semanas depois. Devido a diferenças nos resultados obtidos entre laboratórios e no mesmo laboratório em datas posteriores, é recomendado que as duas amostras sejam enviadas juntas. A produção de IgG anti-*R. rickettsii* ocorre em 1-3

semanas após a exposição. Assim, um título negativo não elimina a possibilidade de infecção (Shaw & Day, 2005). Não existe consenso quanto ao título de IgG mínimo em que se considera estar presente uma infecção activa, quando é feita uma única medição por IFI. Para *R. rickettsii* foram sugeridos títulos  $> 512$  ou  $> 1024$ , quando a medição é realizada sete ou mais dias após o início dos sinais clínicos. Contudo, num estudo experimental com Beagles previamente seronegativos, verificaram-se sinais de doença com picos de  $\text{IgG} \geq 160$  (Mikszewski & Vite, 2005).

**Figura 12** – Imagem de imunofluorescência indirecta positiva para anticorpos anti-*R. conorii* (Alexandre, 2005).



Os títulos elevados de IgG em animais activamente infectados decrescem geralmente ao fim de 3-5 meses, embora se verifique em alguns casos títulos de 128, durante pelo menos dez meses. A avaliação simultânea dos títulos de IgG e IgM pode providenciar um resultado mais exacto, quando se envia apenas uma amostra. Em infecções naturais e experimentais com *R. rickettsii*, os títulos de IgM aumentam durante a primeira semana e diminuem após 4-8 semanas ou menos. No mesmo animal, o título máximo de IgM é geralmente inferior a 2-4 vezes o título de IgG (Greene, 2006). Em cães infectados experimentalmente com *R. conorii*, o título de IgM aumenta rapidamente e desaparece ao fim de 35 dias (Solano-Gallego et al., 2006b).

Uma única titulação de IgM igual ou superior a 64, em conjunto com sinais clínicos sugestivos, também suporta o diagnóstico (Varela, 2003). Contudo, a presença de IgM não prova a infecção aguda, pois são detectados títulos elevados de IgM anti-*R. rickettsii* em canídeos que não seroconvertem, baseando-se nos valores de IgG (Solano-Gallego et al., 2006b). É importante referir que a seroconversão a *R. rickettsii* pode ser retardada ou suprimida pela administração de antimicrobianos no início da doença (Greene, 2006).

Adicionalmente, a interpretação dos resultados serológicos pode ser dificultada se houver reacção cruzada com espécies não patogénicas de *Rickettsia* spp., se houver exposição repetida a ixodídeos com o agente infeccioso, ou ainda se houver infecção persistente com um organismo actualmente não caracterizado, tornando ainda mais importante e fidedigna a titulação na fase aguda e de convalescença (Gasser et al., 2001). Relativamente à ocorrência de reacções cruzadas, o título de Ac contra a riquetsia específica, responsável pela infecção patente, é geralmente o mais elevado.

A IFD permite um diagnóstico rápido, sendo mais fácil encontrar a bactéria em zonas de lesões hemorrágicas, no início da doença e antes do tratamento. Contudo, a IFD não é realizada com frequência, devido à incidência relativamente baixa de lesões cutâneas e à indisponibilidade do método em várias localizações geográficas (Shaw & Day, 2005).

As lesões macroscópicas *post mortem* podem incluir hemorragias petequiais e equimóticas disseminadas por todos os tecidos, linfadenomegália hemorrágica generalizada, esplenomegália, trombos e oclusões venosas, necrose isquémica focal, endocardite valvular e edema pulmonar (CFSPH, 2005b). Histologicamente pode observar-se vasculite necrotizante e infiltrados perivasculares de células inflamatórias na maioria dos tecidos, meningoencefalite aguda com vasculite e gliose nodular focal, necrose hepática e miocárdica, e pneumonia intersticial aguda (Greene, 2006).

## **2.5. Terapêutica**

É imprescindível iniciar o tratamento imediatamente após a colheita das amostras para diagnóstico, de modo a obter uma boa resposta clínica. Pode ser feito um diagnóstico presuntivo, com base na ocorrência sazonal e nas alterações clínicas e laboratoriais. Os antibióticos utilizados são considerados riquetsiostáticos.

Os fármacos de eleição são as tetraciclina: doxiciclina (10-20 mg/kg, por via oral (PO), a cada doze horas (BID), durante 7 dias) ou tetraciclina (22-30 mg/kg, PO, a cada oito horas (TID), durante 7 dias). Alternativamente, estes fármacos podem ser administrados por via endovenosa (EV). A sua utilização, na fase inicial da doença, pode atenuar a resposta imunológica, mas na maioria dos casos não interfere com a confirmação serológica (aumento do título de Ac em quatro ou mais vezes) (Greene, 2006). Estes fármacos devem ser administrados conjuntamente com alimento, de forma a evitar possíveis efeitos gastrointestinais secundários. A doxiciclina não afecta a função renal nem é afectada por esta, sendo preferida à tetraciclina nestes casos. É também recomendada em fêmeas gestantes ou

cachorros com menos de seis meses de idade, devido à discoloração amarelada do esmalte dentário, provocada pela tetraciclina (Tennant, 2005).

As quinolonas enrofloxacin (3 mg/kg, PO ou por via subcutânea (SC), BID, durante 7 dias) ou trovafloxacin são também eficazes. Contudo, o seu uso deve ser restrito a adultos, por possível lesão cartilaginosa nos animais em crescimento. A terapia de suporte é necessária nos animais em choque, com alterações da coagulação e evidência clínica ou laboratorial de insuficiência orgânica. A fluidoterapia endovenosa deve ser utilizada com cautela, pois o aumento da permeabilidade vascular e expansão do volume extracelular podem resultar em edema pulmonar e cerebral (Greene, 2006).

Os corticosteróides sistêmicos, utilizados frequentemente aquando da presença de envolvimento ocular, são controversos pois foram associados a necrose gangrenosa em alguns animais tratados com doses imunossupressoras. Contudo, não foram verificados efeitos deletérios no seu uso, em conjunção com antibioterapia, em animais infectados experimentalmente, manifestando doença ligeira a moderada (CFSPH, 2005b). Podem também ser úteis no manejo da trombocitopenia imunomediada concomitante, não sendo recomendados devido à eficácia da antibioterapia apropriada (Greene, 2006).

## **2.6. Prognóstico**

O prognóstico depende grandemente da progressão da infecção aquando da instituição da antibioterapia, bem como da eficácia da terapia de suporte. Devem ser diagnosticadas com eficiência e tratadas concomitantemente a desidratação, a anemia, as alterações da coagulação e as manifestações secundárias como a insuficiência de vários órgãos (Varela, 2003). A infecção por *R. rickettsii* não tratada é frequentemente fatal. Após o início do tratamento em animais sem sintomatologia neurológica ou grave disfunção de órgãos, a resposta clínica é rápida. Caso haja desenvolvimento de sinais neurológicos, a recuperação pode ser retardada e os défices podem tornar-se permanentes (Shaw & Day, 2005).

Num estudo retrospectivo em cinco animais com sintomatologia neurológica, com início precoce do tratamento, o prognóstico foi bom, recuperando todos os animais em menos de 15 dias (Mikszewski & Vite, 2005). Em casos de tratamento tardio podem verificar-se sinais severos devido à ocorrência de meningite e progressão para encefalomielite (Greene, 2006), bem como uveíte, necrose dos tecidos afectados e poliartrite progressiva crónica (Gasser et al., 2001; Fossum et al., 2007). Os antibióticos apenas são eficazes se forem administrados antes do desenvolvimento de alterações patológicas graves, como trombose e necrose tecidular. As extremidades dos animais que desenvolvem gangrena acabam eventualmente por

recuperar, embora possam permanecer com desfiguração e lesões cicatriciais permanentes. Em estados agudos da doença, a morte pode ocorrer devido a diátese hemorrágica ou trombose de órgãos vitais. As causas mais consistentes de morte ou disfunção permanente de órgãos são devidas a lesão cardiovascular, neurológica e renal. Em alguns animais severamente afectados a morte ocorreu por meningoencefalite rapidamente progressiva e disseminada (Greene, 2006).

Estudos com infecções experimentais indicam que a diminuição da febre ocorre em 24-48 horas após início do tratamento e que a imunidade persiste pelo menos durante três anos. Assim, animais com manifestações clínicas persistentes após o início da antibioterapia apropriada, devem ser avaliados para outras causas de doença ou presença concomitante de outros agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos (Gasser et al., 2001).

## **2.7. Prevenção**

O desenvolvimento de imunidade a riquetsiose por *R. rickettsii* foi observado em estudos experimentais, com duração de pelo menos três anos. Em cães naturalmente infectados nunca foi verificada reinfecção por esta riquetsia. A infecção experimental com riquetsias não patogénicas parece não proteger de infecção subsequente com *R. rickettsii*. Contudo, em certos grupos de canídeos com grande carga de ixodídeos, a exposição crónica a *Rickettsia* spp. não patogénicas ou a infecção subclínica por *R. rickettsii*, parecem contribuir para a prevenção da forma severa da doença. Este facto é evidenciado pela elevada seroprevalência de Ac verificada na população saudável (Greene, 2006).

Até à data, não existe vacina comercialmente disponível para a prevenção da doença, mas resultados experimentais com vacinas baseadas em proteínas recombinantes da membrana exterior de *R. rickettsii* e de *R. conorii* evidenciaram imunoprotecção em roedores. A diminuição da exposição canina a áreas infestadas por ixodídeos, bem como a remoção rotineira destes vectores, representam os meios mais eficazes de prevenção (Greene, 2006). Após remoção de um ixodídeo, deve ser realizada a antissépsia do local de fixação com soluções alcoólicas ou à base de iodo, uma vez que as riquetsias são sensíveis a estas substâncias (CFSPH, 2005b). O uso de acaricidas profilácticos eficazes constitui um dos passos mais importantes para a prevenção, contribuindo também para a diminuição do risco de transmissão da doença para os humanos. Ao diminuir a população de vectores, é interrompido o ciclo biológico e consequentemente, a transmissão do agente ao hospedeiro vertebrado (Varela, 2003).



## 2.8. Implicações para a Saúde Pública

Várias são as riquetsioses consideradas como zoonoses. As do grupo exantemático são importantes pela sua natureza endémica, elevada prevalência e severidade, especialmente quando mal tratadas ou diagnosticadas. As riquetsioses caninas mais importantes são igualmente zoonoses. A espécie *R. rickettsii* é o agente da febre exantemática das Montanhas Rochosas, nos EUA. A prevalência de reacções seropositivas em canídeos de uma dada área é geralmente proporcional ao risco de infecção humana, demonstrando assim o papel de sentinela da espécie canina para a doença humana. Várias são as notificações de doença concomitante entre canídeos e os seus proprietários, devido a exposição simultânea a ixodídeos infectantes (Greene, 2006). A transmissão directa do agente nunca foi documentada (CFSPH, 2005b).

A riquetsia *R. conorii* é o agente da febre escaronodular (*mediterranean spotted fever*), causando febre, prostração, cefaleias, mialgia, artralgia, erupção cutânea maculopapulosa generalizada e uma escara tipicamente negra com halo eritematoso, no local de fixação do ixodídeo vector. Embora a doença seja geralmente ligeira, as formas severas, como as associadas a encefalomielite, estão conotadas com uma elevada taxa de mortalidade (WHO, 2004; Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006). A proximidade de canídeos seropositivos é um factor de risco para a doença em humanos (Solano-Gallego et al., 2006b). A febre escaronodular, também conhecida como febre botonosa, é uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO) em Portugal desde 1950 e o laboratório de referência nacional para as riquetsioses é o Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Galvão et al., 2005).

A taxa de incidência tem vindo a diminuir de 7,6 casos por 100.000 habitantes em 1995, para 3,42 casos por 100.000 habitantes em 2006 (Direcção-Geral da Saúde [DGS], 2006; DGS, 2007). No ano de 2006, o número total de casos notificados foi de 362, correspondendo 134 casos à região Centro e 21 à região do Algarve, regiões com maior e menor número de casos notificados, respectivamente. Os grupos etários maioritariamente atingidos corresponderam às idades entre 1-14 anos, seguidos dos cidadãos com mais de 65 anos de idade. A maior parte dos casos verificou-se em cidadãos do sexo masculino, nos meses de Maio a Outubro, sendo Agosto o mês onde se registou maior frequência (DGS, 2007).

Os canídeos podem aumentar o risco de infecção por riquetsias, ao transportarem ixodídeos para ambientes não endémicos ou para a proximidade dos humanos. A remoção de ixodídeos em canídeos deve ser cautelosa, de modo a evitar a contaminação da pele ou conjuntiva com hemolinfa ou excreções infectantes (Greene, 2006). Os animais infectados devem ser manuseados com cuidado, durante a introdução de cateteres endovenosos e a colheita de

sangue. As amostras suspeitas devem conter etiquetas indicando “perigo de zoonose” a fim de evitar uma infecção inadvertida pelo pessoal de laboratório (Breitschwerdt, 2007b).

### 3. Babesioses e teilerioses

#### 3.1. Etiologia e epidemiologia

Os organismos do género *Babesia* e *Theileria* são protozoários ubiquitários, com distribuição cosmopolita. Pertencem ao filo *Apicomplexa*, ordem *Piroplasmida* e famílias *Babesiidae* e *Theileriidae*, respectivamente (Vial & Gorenflot, 2006). Actualmente, os parasitas pertencentes a estes dois géneros estão sujeitos a intensa investigação e recharacterização molecular, podendo ser necessária a criação de novos géneros (Uilenberg, 2006). Como será referido adiante, existem espécies do género *Theileria* que parasitam canídeos, podendo ocorrer teileriose canina. Contudo, por questões de uniformização e melhor compreensão do texto, os termos “babesiose” e “pequenas babésias”, quando aplicados à espécie canina, serão utilizados para designar respectivamente, a doença e os agentes, pertencentes aos géneros *Babesia* e *Theileria*.

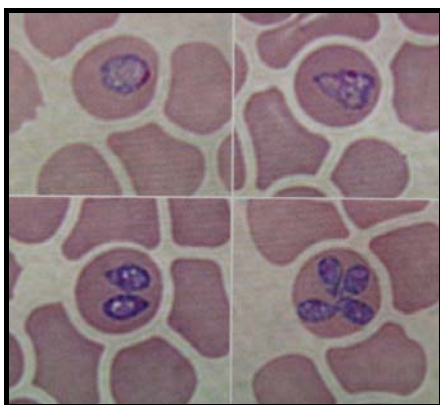
Dado que a babesiose é uma doença emergente em várias regiões, a determinação precisa das espécies que induzem doença clínica em cada localização geográfica é de extrema importância. O sucesso do tratamento pode depender de tal facto, uma vez que a maioria dos fármacos utilizados tem eficácia limitada contra diferentes espécies de *Babesia* spp. Assim, torna-se necessária a utilização de Ag específicos em testes serológicos, de modo a diminuir o risco de obtenção de resultados falsos negativos ou falsos positivos durante a pesquisa (Shaw & Day, 2005).

Até à data, todas as espécies conhecidas são transmitidas por ixodídeos e, por definição, existe transmissão transovárica em *Babesia* spp., enquanto que no caso de *Theileria* spp. apenas se verifica transmissão transtadial. Os hospedeiros vertebrados susceptíveis a infecção incluem vertebrados domésticos e selvagens como grandes e pequenos ruminantes, equídeos, suídeos, canídeos e felídeos. Relativamente aos canídeos, até há pouco tempo apenas eram reconhecidas duas espécies, *B. canis* e *B. gibsoni*, grande e pequena babésia, respectivamente, capazes de produzir doença. Contudo, desde o fim dos anos 80, a espécie *B. canis* foi reclassificada em três novas espécies com base em imunidade cruzada, serologia, especificidade de vectores e filogenia molecular: *B. vogeli* (Figura 13), ligeiramente patogénica; *B. canis* (Figura 14), moderadamente patogénica; e *B. rossi*, altamente

patogénica. Todavia, na maior parte da literatura estas três espécies ainda são referidas como subespécies distintas de *B. canis* (Uilenberg, 2006).

Adicionalmente, foi descrita uma nova grande babésia na Carolina do Norte, nos EUA, *Babesia* sp. n.d.. Esta espécie foi inicialmente detectada num animal imunodeprimido, com alterações clínicas e hematológicas consistentes com babesiose (Birkenheuer, Neel, Ruslander, Levy & Breitschwerdt, 2004). Desde então, foram verificados mais cinco casos de infecção natural, sugerindo que a espécie canina é o hospedeiro vertebrado natural deste organismo. A forma de infecção permanece desconhecida, incluindo vectores e hospedeiros reservatórios (Lehtinen, Birkenheuer, Droleskey & Holman, 2008).

**Figura 13** – Eritrócitos parasitados por *B. vogeli*, em várias formas morfológicas (Shaw & Day, 2005)



**Figura 14** – Eritrócito evidenciando merozoítos de *B. canis*. Coloração por Giemsa (Ramsey & Tennant, 2001)

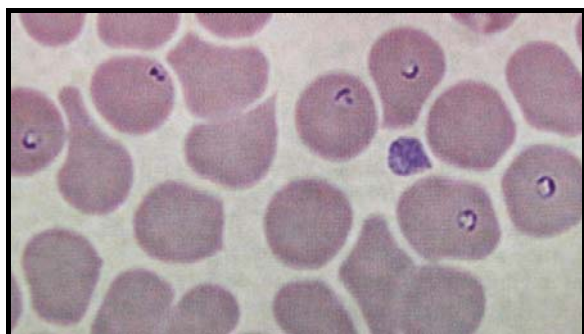


Relativamente às pequenas babésias, existem actualmente pelo menos quatro espécies, genética e clinicamente distintas, que afectam a espécie canina. A pequena babésia *B. gibsoni* (Figura 15), apesar de ser endémica na Ásia, tem ocorrido esporadicamente em várias localizações do mundo. Já foi descrita em Itália e em Espanha e pode alcançar brevemente uma prevalência considerável na Europa, devido à crescente mobilização de canídeos entre zonas endémicas e não endémicas (Bourdoiseau, 2006). É de salientar que não se verifica transmissão transovárica nesta espécie, nem existem provas definitivas que identifiquem os seus ixodídeos vectores (Greene, 2006).

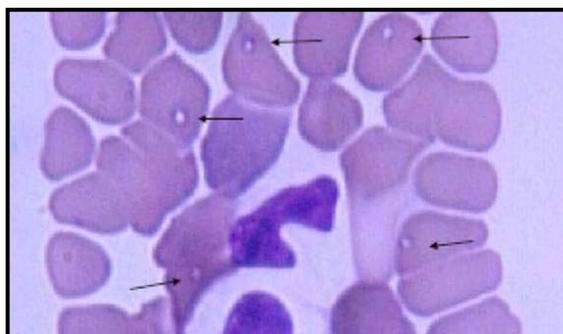
Em 2006, foi identificada a babésia *B. conradae*, no estado da Califórnia, cujo vector é ainda desconhecido, apesar de ter sido observada transmissão transtadial por *R. sanguineus* (Kjemtrup, Wainwright, Miller, Penzhorn & Carreno, 2006). Os sintomas clínicos são semelhantes aos da infecção por *B. gibsoni*, apesar de poder verificar-se maior patogenicidade, resultando em parasitémia e anemia mais pronunciadas (Kjemtrup & Conrad, 2006).

A espécie *T. annae* (Figura 16) parece ser hiperendêmica no noroeste de Espanha, causando doença severa, com maior incidência no Outono e Inverno (García, 2006). Esta espécie foi identificada em cães, raposas e gatos, sendo importante referir que foi detectada por PCR em dois gatos residentes em Portugal, com sintomas de imunodepressão, secundária a infecção pelo vírus da leucemia felina (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003b).

**Figura 15** – Eritrócitos parasitados por *B. gibsoni* (Shaw & Day, 2005)



**Figura 16** – Eritrócitos parasitados por *T. annae*. Coloração por Giemsa (García, 2006)



A espécie *T. equi* foi detectada por PCR e sequenciação de ADN em quatro canídeos, um sintomático e três saudáveis, provenientes de três províncias diferentes de Espanha, em habitats rurais e urbanos. A presença maioritária em animais assintomáticos pode ser indicativa de baixa patogenicidade neste hospedeiro vertebrado (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003a).

Recentemente, foi também identificada a espécie *T. annulata* num canídeo sintomático, proveniente da região da Andaluzia, em Espanha, considerada área endêmica desta parasitose bovina (Criado et al., 2006). Existe assim a ideia de que os agentes relativamente próximos são capazes de infectar vários hospedeiros vertebrados, facto que veio desafiar a percepção anterior de especificidade de hospedeiros para estes parasitas, com potenciais implicações clínicas no que respeita à patogenicidade, diagnóstico e tratamento (Criado-Fornelio et al., 2003b). Na Tabela 1 são resumidas as espécies de *Babesia* e *Theileria* observadas em cães até à data, seus vectores e distribuição geográfica.

Existe uma variação sazonal na ocorrência da infecção por *B. canis*, verificando-se um pico na Primavera e outro no Outono (Schetters et al., 2006). A prevalência da infecção é fortemente afectada pela humidade relativa, que influencia a abundância dos ixodídeos no ambiente (Genchi, 2006). Foi verificada uma prevalência maior em machos (Shaw e Day, 2005). Em áreas endémicas, como em França, a prevalência desta babesiose variou entre 20-30% a 85%. Num estudo retrospectivo no norte de Itália verificou-se que 19 em 23 animais

infectados eram cães de caça, 13 dos quais da raça Setter Inglês. A maioria (74%) dos animais tinha estado numa caçada 5-15 dias antes da apresentação e 43,5% tinham ixodídeos visíveis durante a consulta (Furlanello, Fiorio, Caldin, Lubas & Solano-Gallego, 2005).

**Tabela 1** – Espécies de *Babesia* e *Theileria* observadas em cães, vectores e distribuição geográfica (Criado-Fornelio et al., 2003a; Birkenheuer et al., 2004; Bourdoiseau, 2006; Criado et al., 2006; García, 2006; Greene, 2006; Kjemtrup et al., 2006; Uilenberg, 2006)

Espécie	Vector	Distribuição
<i>B. canis</i>	<i>D. reticulatus</i>	Europa, Ásia
<i>B. vogeli</i>	<i>R. sanguineus</i>	Cosmopolita
<i>B. rossi</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	África
<i>Babesia</i> sp. n.d.	?	Carolina do Norte
<i>B. gibsoni</i>	<i>R. sanguineus</i> (?); <i>H. bispinosa</i> (?)	Cosmopolita
<i>B. conradae</i>	<i>R. sanguineus</i> (?)	Califórnia
<i>T. annae</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>	Norte de Espanha
<i>T. equi</i>	?	Espanha
<i>T. annulata</i>	?	Andaluzia

É de salientar que é reconhecido, há muito, a possibilidade de transmissão destes parasitas através de sangue infectado, como por exemplo por transfusões sanguíneas (Greene, 2006). Adicionalmente, estudos recentes com *B. gibsoni* mostraram uma elevada prevalência de parasitismo entre machos de raças reconhecidas por agressão intra-espécie, como American Staffordshire Terrier, American Pitt Bull Terrier e Tosa, sugerindo que as lutas de cães e consequente contacto com sangue contaminado, podem ser um modo de disseminação importante desta espécie nos EUA, Austrália e certas áreas do Japão (Jefferies et al., 2007b). Nas infecções por *B. rossi* foi também verificada maior prevalência nestas raças, com mortalidade elevada, sugerindo uma susceptibilidade acrescida à doença ou um risco de exposição mais elevado. Suspeita-se que possa ocorrer transmissão transplacentária em relação a *B. canis*, podendo observar-se fraqueza nos descendentes, embora não esteja provada (Greene, 2006). Este tipo de transmissão foi demonstrado experimentalmente na infecção crónica com *B. gibsoni*, resultando em babesiose congénita fatal em toda a ninhada (Fukumoto, Suzuki, Igarashi & Xuan, 2005).

### 3.2. Fisiopatologia

A transmissão do agente ao hospedeiro vertebrado ocorre geralmente alguns dias após a fixação do ixodídeo, pois é necessária a maturação dos esporozoítos, antes de se tornarem infectantes. Durante a alimentação do vector, os esporozoítos são veiculados juntamente com a saliva, fixam-se à membrana eritrocitária e penetram no interior dos eritrócitos por endocitose, diferenciando-se em merozoítos e trofozoítos. A multiplicação destes, resulta

geralmente em duas células filhas, por vezes quatro, danificando a célula hospedeira em fases repetidas de reprodução assexuada, saindo depois para infectar outros eritrócitos (Uilenberg, 2006).

Por definição, os organismos do género *Babesia* apenas se multiplicam nos eritrócitos, enquanto que no género *Theileria* os esporozoítos, numa primeira fase, penetram nos linfócitos ou macrófagos, desenvolvendo-se em esquizontes. Os merozoítos libertados dos esquizontes penetram então nos eritrócitos e multiplicam-se dando origem a quatro células filhas ou tétradas, frequentemente com a forma de cruz de Malta. A replicação em tétradas ou cruz de Malta é também observada em *B. conradae*, embora raramente (Kjemtrup et al., 2006).

A fisiopatologia da babesiose canina consiste em dois processos paralelos: um processo hemolítico e um processo inflamatório (Matijatko et al., 2007). A resposta imunológica tem o papel mais importante. Os organismos desencadeiam um mecanismo de destruição citotóxica dos eritrócitos circulantes, mediada por Ac, sendo depois removidos pelo sistema mononuclear fagocitário. A anemia e a parasitémia são mais severas em animais esplenectomizados. Os Ac são dirigidos contra Ag parasitários incorporados nas membranas de eritrócitos infectados, mas também contra componentes endógenos das membranas eritrocitárias, ocorrendo hemólise intravascular e extravascular, com anemia e hemoglobulinemia (Zygner, Gójska, Rapacka, Jaros & Wedrychowicz, 2007). A anemia hemolítica resultante das infecções por *Babesia* spp. é assim devida à divisão binária intra-eritrocitária dos organismos, à anemia hemolítica imunomediada secundária, às lesões oxidativas dos eritrócitos e à presença de um factor hemolítico no soro, descrito na infecção por *B. gibsoni*, ambos aumentando a susceptibilidade à fagocitose (Gopegui et al., 2007).

O segundo mecanismo fisiopatológico resulta numa síndrome de choque hipotensivo, induzido pelos mediadores inflamatórios e representando uma resposta imunitária exacerbada à infecção (Gopegui et al., 2007). A reacção do organismo na fase aguda de uma infecção desenvolve-se após qualquer lesão inflamatória tecidual e pode levar a vasodilatação, hipotensão e hemodiluição. É considerada como parte da imunidade inata e caracteriza-se por alterações profundas na concentração plasmática das proteínas de fase aguda (PFAs), concentração esta que está relacionada com a severidade da condição subjacente, providenciando um meio de avaliação da presença e extensão da infecção, bem como da resposta ao tratamento. Foi demonstrada a ocorrência de uma resposta marcada na fase aguda da infecção por *B. canis*, com elevação significativa da concentração das principais PFAs (Matijatko et al., 2007). A ocorrência de um processo inflamatório agudo também é sugerida pela elevação do fibrinogénio, achado comum na babesiose canina. Adicionalmente, a fase

aguda é caracterizada por anemia não hemolítica e parasitêmia ligeira (Furlanello et al., 2005; Gopegui et al., 2007).

A trombocitopénia que se verifica na maioria dos animais infectados deve-se provavelmente à destruição imunomediada, sequestro no baço (Zygner et al., 2007) e ao resultado da libertação excessiva de mediadores inflamatórios, durante o processo de lise eritrocitária (Jefferies, Ryan, Jardine, Robertson & Irwin, 2007a). As alterações da hemostase verificam-se em alguns indivíduos e podem dever-se a uma resposta à fase aguda da infecção, a lesão endotelial induzida pela hemólise e a um aumento da interacção dos eritrócitos parasitados com as células endoteliais (Gopegui et al., 2007).

A ocorrência de glomerulonefrite membranoproliferativa é verificada em alguns animais e pode ter uma patogénese imunomediada. Nas infecções por *T. annae* é também sugerida uma componente glomerular da doença, com base nas alterações marcadas dos parâmetros da função renal dos animais afectados. Foram propostos dois mecanismos para esta lesão renal: a) a anemia hemolítica intensa é uma causa potencial de lesão tubular, nefrite intersticial e glomerulopatia; b) a resposta imunomediada pode resultar na deposição de complexos imunes no glomérulo, com subsequente glomerulonefrite (García, 2006).

A hipóxia tecidular contribui grandemente para muitos dos sinais clínicos, induzidos pelas estirpes mais patogénicas. As causas de hipóxia incluem anemia, choque, estase vascular, excessiva produção endógena de monóxido de carbono, e alteração da hemoglobina pelos parasitas, com diminuição da sua capacidade transportadora de oxigénio. Em infecções experimentais, a hipóxia parece ser mais importante do que a hemoglobinúria, na progressão da lesão renal. A formação de ácido láctico, devido à hipóxia tecidular, é considerada a principal razão de ocorrência de acidose metabólica. A alcalose respiratória resulta em parte, da compensação da acidose metabólica, mas mais directamente da hiperventilação causada pela hipoxémia. A peroxidação lipídica que ocorre durante a infecção, aumenta a rigidez dos eritrócitos parasitados e não parasitados, tornando mais lenta a sua passagem pelos leitos capilares. Adicionalmente, a presença de proteases parasitárias solúveis, induz a formação de proteínas tipo fibrinogénio que tornam os eritrócitos mais aderentes, diminuindo ainda mais a velocidade do fluxo sanguíneo. Pensa-se que esta estase vascular contribui para a anemia aguda e para muitos outros sinais clínicos potenciais, sendo mais intensa no sistema nervoso central (SNC) e músculos. No caso de infecções por *B. rossi*, apenas descritas em África, podem desenvolver-se vários sinais atípicos ou complicações. Estas alterações não são directamente explicadas pela hemólise, parecendo resultar da resposta inflamatória do hospedeiro. A lesão tecidular resultante leva provavelmente à libertação de citocinas, provocando inflamação disseminada e lesão adicional em múltiplos órgãos. Verifica-se assim

uma síndrome de disfunção multi-orgânica, resultante da resposta inflamatória sistémica (Greene, 2006).

O sistema imunitário parece não conseguir eliminar completamente a infecção por estes parasitas. Assim, os animais que sobrevivem tornam-se portadores permanentes dos agentes, que ficam sequestrados nos capilares esplénicos, hepáticos e de outros órgãos, sendo libertados periodicamente para a circulação (Shaw & Day, 2005). As consequências clínicas da infecção crónica permanecem pouco clarificadas. Apesar da maior parte dos cães parecer tolerar este estado de premunicação, os animais permanecem em risco de desenvolver complicações imunomediadas e recrudesência da parasitemia e da doença clínica, teoricamente, em caso de comprometimento imunológico, como na terapia imunossupressora ou nas doenças concomitantes. A infecção crónica em alguns indivíduos pode não ter consequências, tornando-se potencialmente benéfica em hospedeiros de zonas endémicas, na protecção de doença futura. Contudo, é uma situação inaceitável em dadores de sangue ou em animais para exportação para zonas não endémicas (Irwin, 2007).

### **3.3. Sinais clínicos**

O primeiro caso de babesiose canina foi descrito por Hutcheon, na África do Sul em 1885 (Lobetti, 2004). Os sinais clínicos variam consoante a espécie, idade, estado imunitário e doenças concomitantes do hospedeiro. Clinicamente, a doença pode classificar-se em forma complicada e não complicada ou pode ser descrita como hiperaguda, aguda, crónica ou subclínica (Gopegui et al., 2007). Apesar de se manifestar em animais de todas as idades, os jovens com menos de um ano de idade são mais susceptíveis, podendo ser uma causa significativa e subdiagnosticada de morbilidade e mortalidade em cachorros de colónias reprodutoras de áreas endémicas. A apresentação hiperaguda, caracterizada por lesão tecidular extensa, é rara (Greene, 2006). O período de incubação da doença por *B. canis* é de 4-21 dias (Furlanello et al., 2005).

Os casos não complicados apresentam sinais clínicos relacionados com hemólise aguda. Pode observar-se febre, depressão, letargia, anorexia, fraqueza, palidez das membranas mucosas, taquipneia, dispneia, taquicardia, pulso hipercinético, linfadenomegália, esplenomegália, icterícia, desidratação, choque, vómito, oligúria e discoloração da urina devido a hematúria, hemoglobinúria ou bilirrubinúria macroscópicas.

As doenças primárias que devem ser diferenciadas da apresentação aguda da babesiose são: outras causas de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) e lúpus sistémico eritematoso. A forma complicada da babesiose canina está predominantemente relacionada com *B. rossi*, mas



também foi descrita em casos de *B. canis* e infecção por pequenas babesias. Possíveis complicações incluem IRA, coagulopatia, hepatopatia, AHIM, edema pulmonar, hipotensão, hemoconcentração, pancreatite aguda, reacções leucemóides, rabdomiólise e alterações neurológicas centrais relacionadas com babesiose cerebral ou hipoglicémia. Complicações raras incluem distúrbios gastrointestinais, mialgia, envolvimento cardíaco, manifestações oculares, sinais do tracto respiratório superior, necrose das extremidades e ascite. A sobreposição de complicações pode também ocorrer (Bourdoiseau, 2006; Greene, 2006; Gopegui et al., 2007).

As manifestações crónicas da infecção estão fracamente caracterizadas, como já foi referido. Os animais infectados com *B. vogeli* são maioritariamente portadores subclínicos. Manifestações subclínicas ou de baixo grau são também verificadas noutras espécies, mais frequentemente com *B. gibsoni*. Pode observar-se febre intermitente, letargia, anorexia parcial, perda de condição corporal, membranas mucosas pálidas, esplenomegália, hepatomegália e linfadenomegália.

### **3.4. Diagnóstico**

A anomalia hematológica mais consistentemente verificada nos animais infectados é a trombocitopénia, com prevalência superior à dos animais com erliquiose (Greene, 2006). Frequentemente verifica-se anemia, inicialmente ligeira, normocítica e normocrómica, tornando-se depois macrocítica, hipocrómica e regenerativa, à medida que a doença progride. A reticulocitose é proporcional à severidade da anemia. Esta última, não se correlaciona com o grau de parasitémia. As anomalias leucocitárias são inconsistentes e de pouca sensibilidade nesta doença, sendo mais comum a neutropénia e linfopénia. O teste de Coombs é positivo na maioria das vezes e a auto-aglutinação eritrocitária é frequente. Nos casos crónicos pode observar-se linfócitos reactivos, indicativos de estimulação antigénica (Shaw & Day, 2005).

Em três estudos retrospectivos realizados em Itália (Furlanello et al., 2005), Espanha (Gopegui et al., 2007) e na Polónia (Zygner et al., 2007), respectivamente com 23, 45 e 248 animais naturalmente infectados com *Babesia canis*, as alterações hematológicas mais frequentes incluíram trombocitopénia ligeira a severa (99,5-100%) e anemia normocítica e normocrómica ligeira a moderada (26-74%). As alterações mais comuns dos parâmetros eritrocitários foram anisocitose (60,5%) e poiquilocitose (25%), sugerindo que a hemólise era imunomediada na maioria dos casos. O aumento do volume plaquetário médio ocorreu entre 15,3-67% dos animais, sugerindo resposta da medula óssea, com libertação de plaquetas

imaturas. A alteração do leucograma observada com maior frequência foi a neutropênia, numa percentagem de 36,3-74%.

Nos estudos espanhol e italiano, foram também analisados outros parâmetros de hemostase. As alterações observaram-se com frequência no estudo espanhol e incluíram prolongamento do tempo de protrombina (TP), do TTPA e do tempo de trombina (TT) em 20% dos animais, e fibrinólise (aumento do dímero-D) em 49%. Diagnosticou-se CID em 20% dos cães. No estudo italiano o TTPA estava significativamente elevado apenas num caso e, em 17% dos animais, verificou-se aumento dos PDFs e do dímero-D, testes sensíveis para o diagnóstico de CID.

As alterações bioquímicas relacionaram-se com a forma e severidade da doença e com o grau de hipóxia. Verificou-se elevação da ALT, AST e FAS, hiperbilirrubinémia, hipoproteinémia, hipoalbuminémia, hipocaliémia, hiperclorémia, acidose metabólica, diminuição do ferro total e da capacidade total de fixação do ferro. A hiperfibrinogenémia foi verificada em 74-100% dos animais. Adicionalmente, no estudo italiano, foi verificada  $\beta$ -hiperglobulinémia, sugerindo uma resposta das IgM, IgA e/ou complemento à estimulação antigénica.

O aumento da ureia sérica, mantendo-se a creatinina dentro dos valores normais, foi verificado em 35-47% dos animais. A elevação da ureia deveu-se provavelmente à hemólise, com libertação de amónia. Por outro lado, pode ser explicada por um catabolismo muscular aumentado, tendo em conta que se verificou aumento da CK na maioria dos animais, podendo ocorrer lesão muscular por *B. canis*, já descrita na infecção por *B. rossi* e na babesiose bovina. No estudo retrospectivo em Espanha, foi verificada uma hiperglicémia não severa em 47% dos animais. A hiperglicémia pode ocorrer em doenças hipermetabólicas, como a babesiose canina, devido ao aumento da mobilização da glucose e ao stress, podendo ser marcadamente aumentada devido à elevação da secreção de cortisol.

A urianálise pode evidenciar bilirrubinúria, hemoglobinúria, proteinúria, cilindros granulares e células do epitélio tubular renal, evidenciando lesão renal (Greene, 2006).

As PFAs proteína C reactiva (CRP) e amilóide A sérica (AAS) têm uma sensibilidade de 100% na infecção por *B. canis*. Contudo, a sua especificidade é muito baixa, limitando o seu uso no diagnóstico da infecção. Todavia, a contagem de plaquetas tem também 100% de sensibilidade, devendo haver uma suspeita de babesiose acrescida aquando da presença concomitante de alteração destes três factores (Matijatko et al., 2007).

Relativamente aos sinais imagiológicos, foi realizado na Galiza, um estudo de ultrasonografia abdominal, com 38 animais infectados naturalmente por *B. canis*. A maioria apresentava lesões esplénicas, seguida de anomalias do parênquima renal e, em menor proporção, lesões hepáticas. As alterações renais mantiveram-se indetectáveis ao exame clínico e nas análises

bioquímicas, demonstrando-se a utilidade da ultrasonografia na detecção precoce de envolvimento renal na babesiose (Fraga, Goicoa, Fraga, Seoane & Barreiro, 2007).

O diagnóstico definitivo de babesiose assenta na demonstração dos parasitas em eritrócitos infectados, amplificação de ADN extraído de sangue ou tecidos, ou serologia positiva. Os organismos de forma piriforme ou amebóide, singulares ou aos pares e de dimensões entre 2,4-3×4-5 µm são característicos da infecção por grandes babésias. As pequenas babésias ocorrem geralmente isoladas, por vezes em tétada, são mais pleomórficas, podendo ter forma piriforme, redonda ou oval e dimensões entre 0,3-2×2,5-4 µm (García, 2006; Kjemtrup et al., 2006; Gopegui et al., 2007).

A parasitémia é geralmente observada a partir do 6º-20º dia, pós-infecção natural (Brandão, Hagiwara & Myiashiro, 2003). Os esfregaços sanguíneos devem ser corados com derivados do método de Romanowsky, como o corante May-Grünwald/Giemsa, em que se observa o núcleo do parasita corado de vermelho e o citoplasma de azul, encontrando-se maior número de eritrócitos parasitados à periferia e no final do esfregaço. É de salientar que alguns dos corantes rápidos disponíveis nas clínicas são considerados como inadequados na coloração destes parasitas. É possível obter parasitémias mais elevadas em amostras sanguíneas colhidas da extremidade do pavilhão auricular ou das unhas, devido ao aumento da rigidez dos eritrócitos e acumulação nos leitos capilares. Adicionalmente, devido à diminuição da densidade dos eritrócitos parasitados por grandes babésias, estes tendem a concentrar-se na camada imediatamente abaixo do *buffy coat* num tubo de hematócrito (HT) (Shaw & Day, 2005).

Embora a observação do parasita em esfregaços sanguíneos seja considerada desde há muito o método *gold standard*, o genótipo destes agentes não pode ser determinado pelo seu fenótipo, havendo limitações reconhecidas na sensibilidade e especificidade do método. A parasitémia associada a *Babesia* spp. é frequentemente muito baixa, especialmente com grandes babésias, durante a infecção crónica ou nos portadores assintomáticos, passando facilmente despercebida e sendo necessário um exame completo e cuidado do esfregaço (Greene, 2006). A incapacidade de detectar o parasita, em animais com anemia hemolítica ou trombocitopénia, levou a diagnósticos incorrectos em casos documentados, geralmente quando a suspeita clínica de babesiose era fraca. Dada a possibilidade de transmissão horizontal, deve-se sempre certificar se houve história de mordedura por outro cão nas últimas 4-8 semanas, independentemente da raça (Irwin, 2007).

A introdução do diagnóstico por PCR mostrou-se eficaz na detecção de casos agudos, podendo existir falsos negativos, na detecção de casos crónicos ou subclínicos de infecção por *B. gibsoni*, se apenas for realizada uma pesquisa, pois a positividade nestes casos é

intermitente. A IFI é provavelmente o método de diagnóstico serológico mais específico e utilizado com maior frequência. A sua principal limitação é a incapacidade de diferenciar infecção aguda de crónica, o que tem importância acrescida nas regiões endémicas. Adicionalmente, a IFI pode não ser eficaz em infecções recentes por *B. gibsoni*, apesar de se mostrar fidedigna em casos crónicos de animais portadores. A combinação de IFI com PCR parece ser assim o método mais promissor de diagnóstico, devido às limitações apontadas (Jefferies et al., 2007a).

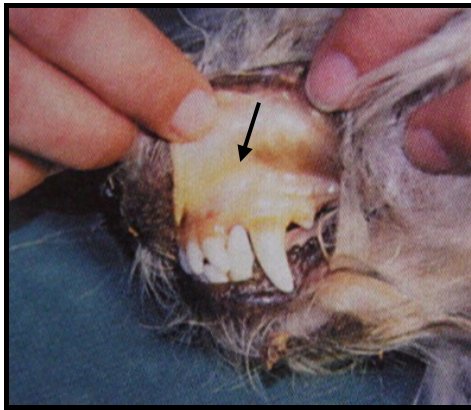
Em animais muito jovens ou cuja análise foi realizada no início da doença, pode verificar-se uma serologia negativa, tornando necessária, em alguns casos, a análise de uma amostra em período de convalescença. A seroconversão é verificada sete dias, pós-infecção experimental com *B. canis*, com títulos crescentes até ao dia 21 (Brandão et al., 2003), mas em casos raros não é observada. Embora haja variação entre os métodos laboratoriais, títulos únicos de Ac anti-*B. canis*  $\geq 80$ , são geralmente suficientes para o diagnóstico. Foi estabelecido um título mínimo de 320 para infecções por *B. gibsoni*. Em alguns estudos foi considerado um título mínimo de 1280 para aumentar a certeza de infecção (Greene, 2006).

A titulação de Ac para o diagnóstico de doenças infecciosas apenas faculta uma evidência indirecta de infecção, podendo ser difícil a interpretação dos resultados devido a reacção cruzada, variações antigénicas entre estirpes/isolados, e variação interlaboratorial. A utilização de títulos mínimos para os casos clínicos também pode levar a um diagnóstico incorrecto, pois nem sempre estão presentes Ac anti-*Babesia* spp. em cães cuja confirmação da infecção foi realizada por PCR, microscopia ou ambos. Adicionalmente, a titulação de Ac para diagnóstico específico da espécie de *Babesia* presente num animal infectado deve ser cautelosa, uma vez que o título mais elevado nem sempre se correlaciona com os resultados de microscopia e PCR (Birkenheuer, Levy, Stebbins, Poore & Breitschwerdt, 2003).

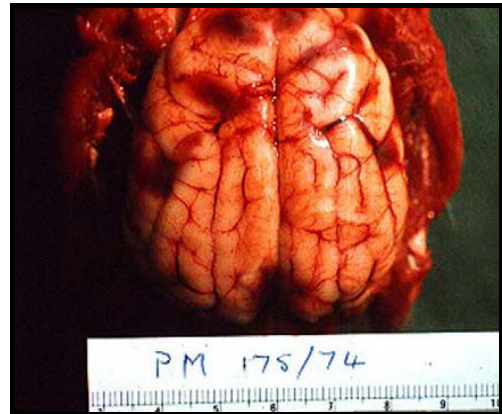
É de salientar que o método de ELISA evidencia resultados muito mais sensíveis que a IFI, mas menos específicos, sendo utilizado mais frequentemente em estudos seroepidemiológicos do que no diagnóstico clínico (Greene, 2006).

Os achados anatomopatológicos e histopatológicos incluem coloração tecidular com hemoglobina ou bilirrubina (Figura 17), hepatoesplenomegália, linfadenopatia e coloração vermelha escura nos rins. Nos casos mais severos verifica-se edema e hemorragia (Figura 18), principalmente nos pulmões, indicativos de lesão vascular e oxigenação tecidular insuficiente. Podem observar-se grandes números de parasitas no baço e nos leitos capilares, especialmente no cérebro. Os eritrócitos não parasitados revestem normalmente o endotélio, localizando-se os parasitados no lúmen. Nos animais com CID, podem evidenciar-se microtrombos. Nos casos crónicos, a esplenomegália pode ser a única alteração verificada (Greene, 2006).

**Figura 17** – Icterícia em cão com babesiose (Day, Mackin & Littlewood, 2000)



**Figura 18** – Hemorragia cerebral disseminada em cão com babesiose cerebral por *B. rossi* (Jacobson, 2006)



### 3.5. Terapêutica

Os fármacos utilizados no tratamento da babesiose resultam no melhoramento dos sinais clínicos, mas raramente alcançam uma verdadeira esterilização do agente. Até à data, poucas são as alterações nas opções disponíveis e eficazes para o tratamento da babesiose.

O dipropionato de imidocarb (5-6,6 mg/kg, por via intramuscular (IM) ou SC, repetido 14 dias depois; 7,5 mg/kg, IM, administração única) e o aceturato de diminazeno (3,5-5 mg/kg, IM, administração única) são os fármacos mais eficazes no tratamento contra as grandes babésias (Greene, 2006). Os efeitos secundários do imidocarb não são comuns e são consistentes com inibição das colinesterases, observando-se ptialismo transiente, vômito, diarreia, tremores musculares, agitação, taquicardia e dispneia, podendo ser aliviados com a administração de atropina (0,05 mg/kg, SC) (Shaw & Day, 2005). Pode verificar-se também dor no local de injeção (Bourdoiseau, 2006). Adicionalmente, este é o fármaco mais utilizado no tratamento da babesiose animal, sendo provável o desenvolvimento de resistências (Vial & Gorenflot, 2006).

O diminazeno está associado a uma taxa elevada de efeitos secundários, devido a um reduzido intervalo terapêutico, podendo observar-se hepatotoxicidade, dor, inflamação e necrose no local de injeção, hemorragia cerebelar, irritação gastrointestinal e sintomatologia neurológica, potencialmente irreversível (Shaw & Day, 2005; Suzuki et al., 2007). É de referir que este fármaco foi retirado do mercado europeu por razões de marketing (Vial & Gorenflot, 2006). O aceturato de diminazeno (3,5-5 mg/kg, IM, repetido 24 horas depois) é também utilizado na terapêutica contra pequenas babésias, apesar da sua eficácia ser maior nas grandes babésias (Greene, 2006).

O tratamento eficaz das infecções por pequenas babésias tem sido difícil de alcançar. O uso combinado de um macrólido, como a azitromicina (10 mg/kg, PO, a cada vinte e quatro horas

(SID), durante 10 dias), com uma hidroxinaftoquinona como a atovaquona (13,3 mg/kg, PO, TID, durante 10 dias), contra a infecção por *B. gibsoni*, tem demonstrado uma verdadeira eficácia clínica e grande segurança, apesar de haver persistência de parasitemia baixa em alguns animais, após o tratamento. Infelizmente, a atovaquona é um fármaco consideravelmente dispendioso e foram identificadas possíveis resistências (Jefferies et al., 2007a).

A procura de melhores fármacos anti-protozoários levou recentemente à investigação de extractos de plantas provenientes de florestas da Indonésia e de África, bem como ao desenvolvimento de uma abordagem farmacológica baseada no metabolismo fosfolipídico do parasita (Vial & Gorenflot, 2006). Adicionalmente, foi realizada na Índia uma comparação terapêutica entre o diminazeno e o fármaco homeopático *Crotalus horridus* 200C (4 comprimidos, PO, a cada seis horas (QID), durante 14 dias), para obviar os efeitos secundários do primeiro, tendo sido concluído que constitui uma alternativa eficaz no tratamento de casos não complicados de babesiose por *B. gibsoni*, mas igualmente sem esterilizar completamente a infecção (Chaudhuri & Varshney, 2007).

A monitorização do tratamento pode ser feita por doseamento das PFAs: CRP e AAS. Em infecções por *B. canis*, a concentração sanguínea destas PFAs diminuiu progressivamente, atingindo valores normais oito dias após o início do tratamento. O HT e o número de plaquetas atingiram valores normais quatro dias após o início do tratamento (Matijatko et al., 2007).

Relativamente à terapia de suporte, estão indicadas transfusões sanguíneas em casos de anemia severa. A decisão deve ser baseada no carácter agudo da doença, nos sinais clínicos, no envolvimento cardíaco ou respiratório e nas análises hematológicas com  $HT \leq 15\%$ . O produto de eleição utilizado na anemia hemolítica é o concentrado de eritrócitos. Se for necessária a hidratação dos animais, devem ser utilizados cristalóides. Contudo, este procedimento deve ser cauteloso em pacientes anémicos, de modo a evitar uma hemodiluição adicional e a ocorrência de dispneia. A oxigenoterapia não alivia a hipóxia em estados anémicos, mas está indicada na babesiose complicada, aquando do desenvolvimento de edema pulmonar (Shaw & Day, 2005). A utilização de glucocorticóides é controversa. Em casos de anemia hemolítica sem resposta ao tratamento etiológico, podem ser necessárias doses imunossupressoras de corticosteróides. Contudo, esta opção pode predispor a outras infecções e tem o potencial de induzir uma recidiva da doença. Por outro lado, a inibição do sistema mononuclear fagocitário resulta frequentemente em parasitémias mais severas, pouco depois do início da corticoterapia (Greene, 2006).

### 3.6. Prognóstico

A resposta clínica é rápida, após o tratamento com imidocarb, em infecções agudas por *B. canis*, começando os eritrócitos a ser produzidos 12-24 horas depois. Tal como já referido, deve ter-se em conta que os fármacos existentes para o tratamento da babesiose são incapazes de eliminar completamente a doença, na dose recomendada, limitando apenas a mortalidade e a severidade dos sinais clínicos. Os proprietários devem estar cientes de que os animais sobreviventes podem permanecer infectados subclínicamente, podendo desenvolver a doença no futuro ou servir como fontes pontuais de disseminação da doença numa dada área (Vial & Gorenflot, 2006). O tratamento numa fase inicial da doença pode evitar o desenvolvimento de uma CID aguda e descompensada (Gopegui et al., 2007).

A babesiose por pequenas babésias é geralmente mais severa e tem um pior prognóstico que inclui choque severo, complicações renais e hepáticas quase sempre constantes e mortalidade mais elevada (Bourdoiseau, 2006). O risco de desenvolvimento de doença severa aumenta nos animais imunodeprimidos, especialmente nos esplenectomizados (García, 2006) e nos cachorros. A co-infecção com outros agentes pode levar a imunossupressão (Greene, 2006). Os casos que envolvam CID, IRA ou AHIM podem ser fatais e a mortalidade relacionada com *B. gibsoni* é devida principalmente à falta de especificidade terapêutica (Suzuki et al., 2007). Relativamente às infecções por *T. annae*, o risco de um animal infectado se apresentar com azotémia na altura do diagnóstico foi estimado em 0,36 e o risco de morte natural ou eutanásia, na primeira semana após o diagnóstico, é de 0,22. A azotémia foi associada à morte com significância estatística. Adicionalmente, verificou-se que um animal infectado tinha o dobro da probabilidade de desenvolver insuficiência renal por cada acréscimo de 4 anos de idade (Camacho et al., 2004).

Nos casos de babesiose por *B. rossi*, as complicações pulmonares e renais, bem como do SNC foram associadas a uma taxa de mortalidade mais elevada: o envolvimento do SNC aumentou o risco de morte em 57 vezes e a disfunção renal, em 5 vezes (Lobetti, 2006).

### 3.7. Prevenção

A dificuldade em obter fármacos específicos para o tratamento da babesiose torna a prevenção deveras importante. O controlo dos vectores é o método primário de prevenção da doença, sendo raramente conseguido em áreas endémicas. A eficiência do controlo de ixodídeos determina grandemente o risco de infecção individual de canídeos mantidos em habitações (Shaw & Day, 2005).

A duração da imunidade protectora contra as grandes babésias é limitada. Os títulos de Ac decrescem gradualmente 3-5 meses após a infecção, verificando-se uma protecção contra infecções homólogas por um período de 5-8 meses (Greene, 2006).

Existe actualmente no mercado uma vacina contra *B. canis*, com antígenos parasitários solúveis derivados de culturas *in vitro* de uma única estirpe, isolada em França. Deve ser administrada isoladamente, com excepção das vacinas para a raiva e para a leptospirose, a partir dos cinco meses de idade. Contudo, existe uma variação antigénica considerável entre estirpes de *B. canis*, tornando esta vacina pouco eficaz em infecções heterólogas, o que se verificou em estudos de campo que revelaram 26,4% de eficácia (Schetters, 2005; Bourdoiseau, 2006). A vacinação não previne a infecção, mas parece bloquear muitos dos processos da fisiopatologia da doença, podendo limitar a parasitémia, a redução do HT e a ocorrência de esplenomegália (Greene, 2006).

O espectro da imunidade protectora contra *B. canis* alargou-se utilizando uma vacina bivalente com uma estirpe de *B. canis* e outra de *B. rossi*, verificando-se protecção contra sinais clínicos de infecções heterólogas, três semanas após a injeção e com uma duração de pelo menos seis meses (Schetters et al., 2006).

A diferença antigénica entre as três espécies *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi*, tem importantes implicações no desenvolvimento de vacinas. Segundo resultados provisórios de estudos experimentais de imunidade cruzada, a recuperação de infecção por *B. canis* ou *B. vogeli* não protege contra *B. rossi*; *B. vogeli* não protege contra *B. canis*; *B. rossi* parece proteger parcialmente contra *B. canis*, e animais imunes a *B. canis* e *B. rossi* não reagem a *B. vogeli* (Uilenberg, 2006).

O estado de premunicação foi reconhecido como importante no controlo dos sinais clínicos da forma mais severa da doença em zonas endémicas. A completa erradicação dos parasitas nos animais infectados destas zonas, através de fármacos que esterilizem a infecção, pode tornar-se potencialmente desvantajosa. Num estudo experimental com *B. canis*, o tratamento com imidocarb resultou numa interrupção da estimulação antigénica, estabilização e diminuição precoce dos títulos de Ac. Os animais mostraram-se susceptíveis após reinfeção com a mesma estirpe, seis meses depois, ao contrário do grupo não tratado. Foi sugerido que títulos de Ac  $\leq 180$  não protegem contra reinfeção com a mesma estirpe, ao contrário de títulos  $\geq 320$  (Brandão et al., 2003).

Adicionalmente, pode ser realizada uma quimioprofilaxia para *B. canis* com imidocarb (4 mg/kg, IM ou SC, administração única), permitindo uma protecção de 4-6 semanas, em animais cuja apresentação contra-indica a utilização de vacina, por exemplo animais com



história prévia de babesiose, pois nestes animais verifica-se uma fraca resposta aos Ag vacinais (Bourdoiseau, 2006).

### **3.8. Implicações para a Saúde Pública**

A babesiose humana é uma doença zoonótica emergente, manifestando-se geralmente de forma subclínica e autolimitante em indivíduos saudáveis e afectando mais severamente indivíduos idosos, imunodeprimidos ou esplenectomizados. Na forma severa pode ocorrer doença febril, hematúria, anemia hemolítica e insuficiência renal. Contudo, a babesiose canina não contribui para a zoonose, pois as espécies que infectam o Homem são: a) *T. microti*, observada nos EUA, sendo os roedores os hospedeiros reservatórios; b) *B. divergens*, mais virulenta e descrita na Europa, sendo os bovinos os hospedeiros reservatórios; c) outras babésias, recentemente identificadas por métodos moleculares. Os vectores são ixodídeos do género *Ixodes* (Vial & Gorenflot, 2006).

Em Portugal, o primeiro caso de babesiose humana foi descrito em 2003 num indivíduo esplenectomizado, de 66 anos de idade, que acabou por morrer devido à ocorrência de insuficiência renal. O agente etiológico implicado foi *B. divergens* (Centeno-Lima et al., 2003).

## **4. Erliquioses e anaplasmoses**

### **4.1. Etiologia e epidemiologia**

As erliquioses e as anaplasmoses caninas são doenças de distribuição cosmopolita, causadas por bactérias Gram negativas pleomórficas, intracelulares obrigatórias, que residem em vacúolos de células eucarióticas. Devido a uma reestruturação taxonómica baseada em análises filogenéticas, estes cocobacilos pertencem desde o ano de 2001 à família *Anaplasmataceae*, ordem *Rickettsiales* e aos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, transmitidos por ixodídeos, e ao género *Neorickettsia*, transmitido por tremátodes (Dumler et al., 2001). Vários são os hospedeiros vertebrados, domésticos e selvagens, potencialmente susceptíveis a estas bactérias, incluindo grandes e pequenos ruminantes, equídeos, canídeos, felídeos, roedores e humanos. No que concerne aos canídeos, são expostas na Tabela 2 as doenças conhecidas, as espécies envolvidas, o tropismo celular, os seus vectores e a distribuição geográfica.

**Tabela 2** – Erliquioses e anaplasmoses caninas, espécies envolvidas, tropismo celular predominante, vectores e distribuição geográfica (Ndip et al., 2005; Greene, 2006)

Doença	Espécie	Tropismo celular	Vector	Distribuição
Erliquiose Monocitotrópica Canina (EMC)	<i>E. canis</i>	Monócitos Macrófagos Linfócitos (?)	<i>R. sanguineus</i> <i>D. variabilis</i>	Europa, Ásia, América África
	<i>E. chaffeensis</i>	Monócitos Macrófagos Neutrófilos Linfócitos	<i>A. americanum</i> <i>D. variabilis</i>	EUA
	<i>E. ruminantium</i>	Endotélio Monócitos Macrófagos Neutrófilos	<i>A. hebraeum</i> (?)	África
Erliquiose Granulocitotrópica Canina (EGC)	<i>E. ewingii</i>	Neutrófilos Eosinófilos	<i>A. americanum</i> <i>R. sanguineus</i> (?) <i>D. variabilis</i> (?)	EUA, Camarões
Anaplasmoose Granulocitotrópica Canina (AGC)	<i>A. phagocytophilum</i>	Neutrófilos Eosinófilos (raramente)	<i>Ixodes</i> spp.	Europa, Ásia América, África
Anaplasmoose Trombocitotrópica Canina (ATC)	<i>A. platys</i>	Plaquetas	<i>R. sanguineus</i> (?) <i>D. auratus</i> (?)	Cosmopolita

A espécie *E. canis* (Figura 19) foi a primeira a ser reconhecida em cães, em 1935 por Donatien e Lestoquard na Argélia, e continua a ser a mais estudada devido à importância patogénica em regiões tropicais e temperadas de quase todo o mundo. Os seus hospedeiros reservatório são o cão, a raposa, o chacal e o coitote. Em Portugal, a seroprevalência obtida por IFI variou entre 5,25% numa população de 400 cães com dono da região do Algarve (Alexandre, 2005), a 50% numa população de 104 cães do canil municipal de Setúbal (Bacellar et al., 1995). Também em Setúbal, foi verificada uma seroprevalência de 44,26% numa população assintomática de 61 canídeos domésticos errantes, nos quais foram colhidos 213 ixodídeos, pertencentes ao género *Rhipicephalus* (Silveira, 1992). Em Espanha, a seroprevalência variou entre 1,98% nas Ilhas Canárias, a 19,2% em Castilla-León, de acordo com estudos epidemiológicos (Aguirre et al., 2004). A maioria dos casos ocorre durante as estações mais quentes do ano, altura em que o vector é mais abundante, embora possam ser relatadas ocorrências durante todo o ano, devido à existência de infecção persistente, tal como observado num estudo retrospectivo realizado na Grécia, com 19 casos crónicos (Mylonakis et al., 2004).

Nos EUA, a bactéria *E. chaffeensis*, agente etiológico da erliquiose monocitotrópica humana, infecta naturalmente os canídeos. O veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) serve como hospedeiro reservatório do agente e possivelmente, cães e outros carnívoros também têm este papel. A erliquia *E. ruminantium*, agente etiológico da doença de *Heartwater* em

ruminantes, foi detectada em cães saudáveis e doentes em África, mas a sua virulência, vectores potenciais e classificação definitiva permanecem por averiguar (Greene, 2006).

A erliquiose granulocitotrópica canina, causada por *E. ewingii* tem sido relatada apenas nos EUA. Contudo, foi identificada recentemente por PCR em 2 de 104 cães, um sintomático e outro assintomático, nos Camarões, em África (Ndip et al., 2005). O hospedeiro reservatório nos EUA é também o veado de cauda branca, à semelhança de *E. chaffeensis*.

A anaplasmosse granulocitotrópica canina é provocada pela espécie *A. phagocytophilum* (Figura 20), que engloba três agentes anteriormente designados por *E. equi*, *E. phagocytophila* e “agente da erliquiose granulocítica humana”, transmitida por vários vectores do género *Ixodes*, o que condiciona a sazonalidade e distribuição geográfica da infecção. Na Europa, o ixodídeo *I. ricinus* tem o papel de vector. Na Suécia, a maioria dos casos caninos é diagnosticada desde meados do Verão até ao Outono. No continente europeu, os hospedeiros naturais da bactéria incluem ovinos e o corço (*Capreolus capreolus*). Roedores e cervídeos têm o papel de reservatórios, havendo ainda potencial para a distribuição ou disseminação geográfica por parte de aves migratórias (Stuen, 2007).

A espécie *A. platys* (Figura 21), agente da anaplasmosse trombocitotrópica canina ou trombocitopénia cíclica infecciosa canina, é provavelmente transmitida por um ixodídeo vector, apesar de não ter sido demonstrado conclusivamente o seu modo natural de transmissão. A bactéria foi identificada nos ixodídeos *R. sanguineus* e *D. auratus*, mas ainda não foi conseguida experimentalmente a sua transmissão nestes vectores. Na Sicília, foi verificada uma prevalência de 4%, numa amostra de 344 cães testados por PCR. Nenhum foi positivo a *A. phagocytophilum* (Fuente et al., 2006).

**Figura 19** – Mórula de *E. canis* em monócito. Coloração por Giemsa (Shaw & Day, 2005)



**Figura 20** – Mórula de *A. phagocytophilum* em neutrófilo. Coloração por Giemsa (Arsenault & Messick, 2005)



**Figura 21** – Mórula de *A. platys* em plaqueta. Coloração por Giemsa (Greene, 2006)



A transmissão transovárica das erliquioses não é conhecida nos ixodídeos, parecendo que a infecção ocorre na fase de larva ou ninfa, ao se alimentarem nos hospedeiros vertebrados, verificando-se depois transmissão transtadial. Nos canídeos, é também possível ocorrer transmissão iatrogénica por transfusão sanguínea e foi sugerida a possibilidade de transmissão mecânica ou biológica por outros artrópodes. Na Austrália, identificou-se por PCR a presença de *A. platys* em piolhos *Heterodoxus spiniger*, removidos de cachorros (Brown, Martin, Roberts & Dunstan, 2005). Adicionalmente, foi verificada a presença de *A. phagocytophilum* em larvas de ácaros *Neotrombicula autumnalis*, no norte de Espanha (Solano-Gallego et al., 2006a).

Relativamente ao género *Neorickettsia*, foram identificadas experimentalmente em canídeos as espécies *N. sennetsu*, agente da febre Sennetsu em humanos no Japão e Malásia, e *N. risticii*, agente da erliquiose monocitotrófica equina nos EUA e Canadá. Foi também verificada infecção natural em cães com uma estirpe atípica desta última espécie, nos EUA. Adicionalmente, o cão é hospedeiro natural da bactéria *N. helminthoeca*, agente da doença do envenenamento por salmão, de importância patogénica nos EUA (Greene, 2006).

## 4.2. Fisiopatologia

O tempo mínimo de fixação dos ixodídeos, necessário para a transmissão dos agentes etiológicos, através das secreções salivares, permanece desconhecido, excepto para a espécie *A. phagocytophilum*, cujos vectores *Ixodes* spp. requerem 24-36 horas (Davoust et al., 2003). Durante um período de incubação de 1-2 semanas (8-20 dias para *E. canis*), os organismos multiplicam-se por divisão binária em macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, no caso das espécies monocitotróficas, em leucócitos, no caso das espécies granulocitotróficas, ou em plaquetas, no caso da espécie *A. platys*, resultando em agregados característicos denominados mórulas que se disseminam por todo o corpo, após a ruptura da célula hospedeira. A inibição da fusão entre lisossomas e fagossomas, bem como da apoptose nas células hospedeiras, permite a multiplicação e sobrevivência das bactérias, que tendem a ser mais abundantes em tecidos do sistema mononuclear fagocitário como a medula óssea, baço, fígado e linfonodos. As mórulas de *A. phagocytophilum* são também frequentes em neutrófilos do sangue periférico (Greene, 2006). As células infectadas podem induzir a ocorrência de vasculite e subsequente coagulação intravascular (Varela, 2003).

A fisiopatologia das infecções por *Ehrlichia* spp. está relacionada com a evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro e desregulação do sistema imunitário, resultando em infecções persistentes. Por um lado, verifica-se supressão da imunidade celular e por outro,

respostas humorais exageradas. Uma das formas de evasão é através de variações nos epítomos imunogénicos, por recombinações genéticas repetidas (Hess, English, Hegarty, Brown & Breitschwerdt, 2006). Adicionalmente, estudos *in vitro* com *E. canis* revelaram uma inibição da expressão dos receptores da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC-II), em células mononucleares infectadas. Estes receptores são glicoproteínas membranárias, com funções de apresentação de antígenos, interacção com os linfócitos  $T_{Helper}$  e regulação da função dos macrófagos (Harrus et al., 2003). Foi também verificada uma diminuição do rácio linfocitário  $CD4^{+}:CD8^{+}$  ( $T_{Helper}:T_{Citotóxicas}$ ), com aumento das últimas e por vezes, diminuição das primeiras (Heeb, Wilkerson, Chun & Ganta, 2003). Por um lado, as células  $CD8^{+}$  podem representar uma resposta imunitária protectora, contra a infecção intracelular persistente por *E. canis*, mas por outro lado, podem mediar a lesão tecidular, através da eliminação citolítica das células infectadas, contribuindo para a patogénese da doença (Castro, Machado, Aquino, Alessi & Costa, 2004).

Os animais imunocompetentes por vezes eliminam o agente. Caso contrário, podem permanecer portadores subclínicos para toda a vida ou entrar na fase crónica da infecção. Esta última, é complicada na sua forma severa pela diminuição da produção de elementos sanguíneos na medula óssea, resultando em pancitopénia. Pensa-se que o baço tem um papel importante na patogénese e expressão da doença, sequestrando as bactérias durante a fase subclínica da infecção. Os factores que levam ao desenvolvimento da fase crónica da EMC permanecem desconhecidos (Shaw & Day, 2005).

Evidências recentes sugerem que a severidade clínica da EMC pode estar relacionada com a natureza da resposta imunológica do hospedeiro ( $T_H1$  versus  $T_H2$ ) e com o perfil de citocinas induzido pós-infecção, em estudos experimentais com cães. Aparentemente, a imunidade celular e a secreção de Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) desempenham um papel predominante na recuperação e imunidade à infecção, verificando-se níveis elevados de IFN- $\gamma$  associados a doença ligeira, enquanto que nos animais severamente afectados foram detectados níveis persistentemente elevados de interleucina(IL)-8 e IL-1 $\beta$  (Siarkou, Mylonakis, Bourtzi-Hatzopoulou & Koutinas, 2007).

A infecção por *E. canis* resulta na formação de Ac específicos. As IgM e IgA verificam-se 4-7 dias pós-infecção e as IgG aumentam geralmente quinze dias pós-infecção. Contudo, estes Ac têm um papel mínimo na eliminação do agente infeccioso. Não se verifica protecção à reinfeção em animais com títulos elevados de Ac anti-*E. canis*. Adicionalmente, estes podem ter um efeito prejudicial na progressão da doença, devido às suas consequências imunopatogénicas. Existe uma evidência crescente que suporta o papel de mecanismos hiperimunes na patogénese da EMC, incluindo infiltração plasmocitária extensa da medula

óssea e dos órgãos parenquimatosos, resultando em vasculite (Castro et al., 2004); ocorrência de hipergamaglobulinémia policlonal, não correlacionada com os títulos específicos de Ac anti-*E. canis*; testes de Coombs e de auto-aglutinação positivos; produção de Ac anti-plaquetários; e formação de complexos imunes circulantes. A ocorrência de amiloidose AA reactiva, com proteinúria e glomerulopatia foi também implicada como uma complicação patológica da infecção crónica por *E. canis* (Greene, 2006). Adicionalmente, foram verificados Ac antinucleares em 3/18 animais infectados por *E. canis*, desconhecendo-se se a sua presença tem significado patogénico (Smith, Tompkins & Breitschwerdt, 2004).

A positividade em testes de Coombs e de auto-aglutinação, indica que a infecção induz a produção de Ac que se ligam à membrana eritrocitária, embora ainda não tenha sido determinado se estes Ac são verdadeiros auto-anticorpos, específicos para Ag eritrocitários (Shaw & Day, 2005).

Vários mecanismos estão envolvidos na patogénese da trombocitopénia, que se verifica em todas as fases da doença, incluindo aumento do consumo, devido à vasculite (Varela, 2003) e diminuição do tempo de semi-vida, provavelmente como resultado de sequestração esplénica e destruição imunomediada. Na fase aguda, além da existência de Ac anti-plaquetários, detecta-se também uma citocina sérica – o factor de inibição da migração plaquetária (FIMP) – produzida pelos linfócitos, quando expostos a monócitos infectados, e ocorrendo em níveis proporcionalmente inversos à contagem plaquetária. Na fase crónica, considera-se que o mecanismo responsável pela trombocitopénia é a diminuição de produção, como resultado da hipoplasia da medula óssea (Greene, 2006). A função plaquetária está diminuída nos animais infectados, em parte devido à interferência dos Ac com glicoproteínas membranárias, inibindo a agregação plaquetária, o que contribui para as hemorragias observadas na EMC, em conjunção com a trombocitopénia (Shaw et al., 2001).

As alterações neuromusculares verificadas nas erliquioses resultam primariamente de meningite ou meningoencefalite, por inflamação e/ou hemorragia, principalmente em infecções por *E. canis* e estirpes granulocitotrópicas, como *E. ewingii* e *A. phagocytophilum*. A disfunção neurológica ocorre por lesão do tecido nervoso periférico ou central adjacente. A ocorrência de poliartropatia pode dever-se a hemartrose ou deposição de complexos imunes, resultando em artrite e efusão neutrofílica, e verificando-se com maior frequência nas infecções por estirpes granulocitotrópicas, como *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* (Shaw & Day, 2005). As lesões oculares observadas devem-se a infiltrados inflamatórios linfocíticos, monócitos e plasmocíticos, hemorragias e vasculite (Komnenou et al., 2007). Pode ainda ocorrer glomerulonefrite e plasmocitose intersticial renal, sendo responsáveis pela proteinúria em alguns casos.

Desconhece-se o mecanismo exacto pelo qual as bactérias *A. phagocytophilum* causam doença. *In vitro*, os neutrófilos infectados estimulam a produção de IL-8 e outras citocinas, que inibem a hematopoiese, resultando posteriormente em mielossupressão. Suspeita-se que o mecanismo responsável pela ocorrência de trombocitopénia nos indivíduos infectados, se deva a um aumento do consumo plaquetário por fenómenos de coagulação, tendo sido documentado *in vitro* um aumento da actividade procoagulante tecidular, por parte de monócitos do sangue periférico. É também verificado um aumento do IFN- $\gamma$  nos primeiros 8-10 dias, parecendo ser importante no controlo inicial da bacteriémia. Após este período, pensa-se que a imunidade humoral e celular são responsáveis pelo controlo da infecção. Relativamente à ATC, é verificada uma natureza cíclica da bacteriémia e subsequentes episódios de trombocitopénia com duração de 3-4 dias, ocorrendo com 1-2 semanas de intervalo. No primeiro episódio é verificada a maior percentagem de plaquetas infectadas, em comparação com os seguintes, mas os episódios de trombocitopénia são sempre tão severos como o primeiro. A trombocitopénia inicial desenvolve-se primariamente como consequência da lesão provocada pela replicação dos organismos, mas os mecanismos imunomediados de remoção plaquetária parecem ser mais importantes durante os episódios subsequentes. A natureza cíclica destes episódios diminui com o tempo, resultando em trombocitopénia ligeira com ocorrência esporádica dos organismos nas plaquetas (Greene, 2006).

#### **4.3. Sinais clínicos**

A severidade clínica da EMC é muito variável entre os indivíduos devido a vários factores, como a virulência da estirpe de *E. canis* envolvida e a existência de imunodeficiência ou doenças concomitantes, nomeadamente doenças transmitidas por ixodídeos. Contudo, é cada vez mais aceite o conceito de que a severidade se deve primariamente à resposta imunitária do hospedeiro e não à estirpe envolvida. A importância da estirpe de *E. canis* foi recentemente posta em causa relativamente à severidade da doença, não se encontrando correlação entre esta e uma estirpe estudada na Grécia, sendo necessários mais dados de outras estirpes para o estudo do seu papel na patogenicidade da EMC (Siarkou et al., 2007). Não existe predilecção de idade ou sexo, mas a raça Pastor Alemão parece ser mais susceptível, manifestando uma doença mais severa e com pior prognóstico (Mylonakis et al., 2004). A susceptibilidade verificada pode ser atribuída à incapacidade em exibir uma resposta imunitária adequada, tendo sido verificada uma diminuição na resposta imunitária celular a *E. canis*, em comparação com a raça Beagle, sem diferenças significativas na resposta humoral (Greene, 2006). Os animais jovens parecem ser mais susceptíveis à doença severa (Shaw et al., 2001).

A EMC foi dividida em três fases de acordo com os sinais clínicos e alterações clínico-patológicas verificadas em infecções experimentais: aguda, com duração de 2-4 semanas; subclínica, podendo durar meses a anos; e crônica, durando meses. Embora estas fases possam ser utilizadas para inferir alguma utilidade clínica, é difícil de estabelecer o início e duração de cada fase, em infecções naturais.

Os sinais na fase aguda podem variar de ligeiros e não específicos, a severos e potencialmente fatais. Incluem frequentemente febre, anorexia, depressão, letargia, ligeira perda de peso e taquipneia, com ou sem tendências hemorrágicas. Se estas estiverem presentes ocorrem geralmente sob a forma de petéquias e/ou equimoses (Figura 22) na pele e membranas mucosas. Ocasionalmente observa-se epistaxis (Figura 23). Pode também observar-se linfadenomegália e esplenomegália. Sinais menos frequentes incluem vômito, dispneia, corrimento oculonasal seroso a purulento (Shaw & Day, 2005), diarreia, tosse (CFSPH, 2005a), hepatomegália e perda de pêlo (Castro et al., 2004).

**Figura 22** – Petéquias no abdômen ventral em cão com erliquiose monocitotrópica canina (EMC) (Shaw & Day, 2005)



**Figura 23** – Epistaxis em cão com EMC (Alexandre, 2005)



Os sinais clínicos, na forma crônica severa da doença, podem ser semelhantes aos da fase aguda, contudo mais graves. Por exemplo, em 20 animais com EMC, 3/10 animais com a forma não mielossupressiva apresentavam tendências hemorrágicas e mucosas pálidas, enquanto que todos os animais (10/10) com a forma mielossupressiva apresentavam estes mesmos sintomas (Siarkou et al., 2007). Em 19 animais com EMC crônica, todos apresentavam tendências hemorrágicas, seis deles com epistaxis (Mylonakis et al., 2004). Adicionalmente pode verificar-se emaciação, edema periférico, especialmente nos membros posteriores e escroto, hipotermia, estomatite ulcerativa, poliúria e polidipsia, icterícia e piodermite. É possível a ocorrência de infecções secundárias, pneumonia intersticial e insuficiência renal durante esta fase. Foram associadas algumas alterações do foro reprodutivo



com a forma crónica da EMC, incluindo prolongamento do corrimento sanguíneo no estro, infertilidade, aborto e morte neonatal (Shaw & Day, 2005).

A nível ocular as alterações são verificadas tanto na fase aguda como crónica, podendo ocorrer entre 15-100% dos casos. Em 90 e em 17 casos de EMC com sintomatologia ocular, 33 e 11 animais, respectivamente, apresentavam em exclusivo, este tipo de manifestações (Leiva, Naranjo & Peña, 2005; Komnenou et al., 2007). Entre as ocorrências mais frequentes encontra-se a uveíte bilateral (75,5%) ou unilateral (24,5%), principalmente anterior (64,5%). Nos casos de uveíte (Figura 24) verifica-se hiperémia conjuntival e episcleral, edema da córnea com consequente opacidade, miose, blefarospasmo, fotofobia, diminuição da pressão intra-ocular, *flare* aquoso, hifema, hipópion, precipitados queráticos, hiperpigmentação da íris e sinéquias posteriores, podendo ocorrer glaucoma secundário à uveíte crónica (Figura 25). As outras alterações comuns são sinais de doença retinal (Figura 26), como coriorretinite, neurite do nervo óptico com edema do disco óptico, hemorragia, infiltrados perivascularres e descolamento, podendo resultar em cegueira aguda, frequentemente devida a gamopatia monoclonal com síndrome de hiperviscosidade secundário. É também verificada conjuntivite, corrimento ocular, petéquias e equimoses na conjuntiva ou íris, úlceras da córnea, esclerite necrotizante e diminuição da produção de lágrimas. A ocorrência de uveíte foi também verificada em casos de ATC, bem como num caso de AGC (Arsenault & Messick, 2005).

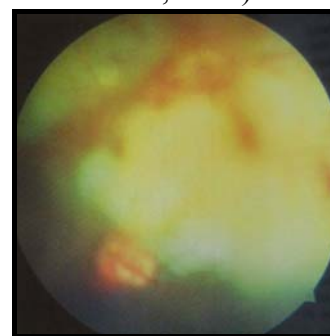
**Figura 24** – Uveíte anterior unilateral crónica em cão com EMC (Komnenou et al., 2007)



**Figura 25** – Uveíte e glaucoma secundário em cão com EMC (Shaw & Day, 2005)



**Figura 26** – Exame do fundo do olho. Hemorragia e descolamento exsudativo da retina (Leiva, Naranjo & Peña, 2005)



Os sinais neuromusculares observam-se nas fases aguda e crónica, mas são mais frequentes na primeira (Varela, 2003) e são indistintos dos observados na infecção por *R. rickettsii*. Pode observar-se convulsões, estupor, ataxia com disfunção do neurónio motor superior ou inferior, disfunção vestibular aguda central ou periférica, anisocoria, disfunção cerebelar, tremores de intenção, hiperestesia generalizada ou localizada, défices dos nervos cranianos e coma (CFSPH, 2005<sup>a</sup>; Shaw & Day, 2005; Greene, 2006). Foi também verificada polimiosite com

tetraparésia, hiporreflexia e atrofia muscular. Secundariamente a poliartropatia, pode verificar-se claudicação com locomoção rígida, edema e dor articulares, bem como relutância ao se levantar.

Nas infecções por *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* e *A. platys*, observa-se geralmente um quadro clínico mais ligeiro, do que o observado nas infecções por *E. canis*. Até à data não foi documentada em canídeos infecção crónica clínica por *A. phagocytophilum*. Relativamente a este agente, não foi verificado até ao momento predisposição de sexo nem raça, mas a idade pode ser um factor susceptível. Em estudos realizados na Suécia e EUA, um terço dos animais tinha mais de nove anos, e 56% dos animais tinham mais de 8 anos, respectivamente. Nestes animais não se verificaram tendências hemorrágicas, ao contrário de alguns casos de *E. canis* e *A. platys* (Greene, 2006).

#### **4.4. Diagnóstico**

A trombocitopénia, com ou sem presença de megatrombócitos, é a alteração hematológica mais consistente nas erliquioses. Na infecção por *E. canis*, foi verificada em 82% dos casos e em todas as fases. Outras alterações durante a fase aguda incluem anemia (82%), geralmente não regenerativa, leucopénia ligeira em 32% dos animais, dos quais 20% apresentam neutropénia, e monocitose absoluta com monócitos reactivos (Shaw & Day, 2005). Na fase subclínica, geralmente só ocorre trombocitopénia, mas pode verificar-se uma diminuição ligeira do HT e da contagem leucocitária, bem como hipergamaglobulinémia (Varela, 2003). Na AGC não se verifica neutropénia, mas sim leucopénia e eosinopénia. Na ATC as contagens plaquetárias são geralmente inferiores a  $20 \times 10^3/\mu\text{L}$  e pode ocorrer ligeira anemia normocítica e normocrómica (Greene, 2006).

Na fase crónica severa da EMC pode ainda ocorrer pancitopénia (18%). Num estudo entre a forma não mielossupressiva e mielossupressiva de EMC, observou-se eosinopénia (70%), linfopénia (50%) e monocitopénia (80%) no primeiro grupo, e eosinopénia (100%), linfopénia (80%) e neutropénia (80%) no segundo grupo (Siarkou et al., 2007). A análise do mielograma pode revelar hipoplasia das linhas eritróide, mielóide e megacariocítica, frequentemente com infiltração plasmocítica. Nos casos agudos verifica-se geralmente uma medula hipercelular (Mylonakis et al., 2004). Em alguns animais com EMC crónica foi também observada linfocitose granular (consistindo em grandes linfócitos  $T_{\text{Citotóxicos}}$  ou células *Natural Killer*), podendo ser confundida com leucemia linfocítica bem diferenciada (Heeb et al., 2003).

Relativamente às alterações nas proteínas séricas, verifica-se hiperproteinémia (21-33%) ou hipoproteinémia (16-40%), hiperglobulinémia (15-39%) e hipoalbuminémia (43-75%). Na

infecção crónica por *E. canis* ocorre geralmente uma gamopatia policlonal, mas ocasionalmente pode observar-se gamopatia monoclonal. Esta última, em associação com plasmocitose severa da medula óssea, pode levar a um diagnóstico errado de mieloma plasmocítico. Outras alterações incluem aumento da ALT (43-72%), da FAS (31-35%), da ureia (38%) e da creatinina (11-28%) séricas, proteinúria sem sedimento activo (31,5-59%), consistindo principalmente em albumina, aumento do rácio proteína/creatinina urinário e hematúria (Mylonakis et al., 2004; Greene, 2006; Siarkou et al., 2007).

Pode verificar-se um aumento do tempo de coagulação, mesmo em animais com contagens plaquetárias normais, e um padrão pulmonar intersticial ligeiro a marcado, consistente com pneumonia intersticial. A análise do LCR em animais com sintomatologia neurológica pode revelar aumento da fracção proteica e pleocitose, predominantemente linfocítica, semelhante à verificada em infecções virais.

A identificação microscópica de mórulas, em esfregaços de sangue periférico, é uma das formas de diagnóstico destas doenças. Existem três formas intracitoplasmáticas descritas: corpo inicial, corpo elementar e mórula, aparecendo como inclusões basófilas, observáveis com corantes derivados do método Romanowsky (CFSPH, 2005a). Estas inclusões podem ser confundidas com plaquetas, grânulos linfocíticos azurófilos, corpos linfoglandulares e material nuclear fagocitado. Adicionalmente, as mórulas encontram-se geralmente em número muito pequeno e são transitórias, tendo sido verificadas em apenas 4% dos casos com *E. canis*. Assim, este método de diagnóstico é difícil, podendo contudo ser optimizado se forem realizados esfregaços do *buffy coat* ou de sangue colhido dos capilares periféricos do pavilhão auricular. É possível observar-se mórulas em punções aspirativas de linfonodos, baço, pulmão, líquido sinovial e raramente, no LCR (Shaw & Day, 2005). Foram detectadas várias mórulas de *E. canis* em monócitos maduros e monoblastos, em punções de medula óssea, 15 dias após infecção experimental, em contraste com raras mórulas presentes no sangue periférico, denunciando uma maior sensibilidade neste tipo de amostra (Moreira, Machado & Passos, 2005).

Devido às limitações da microscopia óptica, o diagnóstico de erliquiose é geralmente baseado em resultados positivos de IFI. Este método pode detectar Ac a partir dos sete dias pós-infecção. Contudo, alguns animais tornam-se seropositivos apenas aos 28 dias pós-infecção. Assim, uma amostra colhida na fase aguda da infecção pode originar um resultado negativo, sendo recomendado proceder à análise de um título de convalescença 2-3 semanas depois (Greene, 2006), demonstrando-se infecção activa se houver aumento igual ou superior a quatro vezes o valor do primeiro título, e/ou realizar o serodiagnóstico para outros agentes infecciosos, uma vez que são frequentes as infecções concomitantes. Pode ainda verificar-se

falsos negativos em casos agudos, quando o título de Ac é tão elevado que provoca uma obstrução à normal formação dos complexos Ac-Ag, ocorrência conhecida como efeito pró-zona, tendo sido verificado num caso de AGC (Arsenault & Messick, 2005). Na fase terminal da doença ou em animais severamente pancitopénicos, os títulos de Ac podem diminuir drasticamente, tendo sido verificado em 1/19 casos de EMC crónica mielossupressiva (Mylonakis et al., 2004).

A obtenção de resultados serológicos positivos sugere infecção, mas não confirma necessariamente a doença activa, uma vez que se verificam títulos persistentes de Ac após o tratamento ou potencial recuperação, o que é de especial relevância em regiões endémicas. Devido às diferentes metodologias laboratoriais, não existe consenso quanto ao título mínimo de Ac que evidencie infecção/exposição, considerando-se geralmente um título  $\geq 40$  ou  $\geq 80$  (Shaw & Day, 2005). Em animais não tratados, verifica-se um pico de Ac anti-*E. canis* aos 80 dias pós-infecção. Geralmente, 3-9 meses após tratamento eficaz, é verificada seronegatividade, embora alguns cães mantenham títulos persistentes e estáveis durante anos. É de salientar que o título de Ac não se correlaciona com a duração da infecção, ou com a severidade da doença (Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002).

Com base em análises de Western Blot, títulos baixos obtidos por IFI não são diagnóstico, podendo representar exposição a outros agentes infecciosos, uma vez que se verificam reacções cruzadas entre as várias espécies de *Ehrlichia* spp.. Adicionalmente, animais com infecção por *E. canis* podem ser positivos a Ag de *A. phagocytophilum*, mas o contrário apenas se verificou em metade dos animais e nas amostras de convalescença, num estudo na Suécia. Animais infectados por *A. platys* podem ser seropositivos a Ag de *A. phagocytophilum* (Greene, 2006), e Ag de *E. canis*, facto verificado em 4/13 animais (Otranto et al., 2008). Praticamente não existe reacção cruzada entre *E. canis* e *R. rickettsii*.

O método de ELISA, com a utilização das primeiras glicoproteínas recombinantes (gp36 e gp19) a induzirem resposta de Ac e específicas para *E. canis*, evidencia resultados altamente específicos e mais sensíveis, em comparação com IFI, na detecção de baixos títulos de Ac produzidos durante a fase aguda inicial da doença, surgindo assim como uma poderosa ferramenta de diagnóstico (Cárdenas et al., 2007). Os testes rápidos de diagnóstico baseados em ELISA, disponíveis para utilização *in situ* nas clínicas, apresentam elevada especificidade, variando entre 0,98-1,00, conforme o teste utilizado. Contudo, a sensibilidade é baixa em animais com baixo título de Ac, mas elevada (entre 0,91-1,00) em amostras cuja IFI revelou títulos  $\geq 320$  (Harrus, Alleman, Bark, Mahan & Waner, 2002).

O método de Western Blot tem sido utilizado apenas em investigação, mas no futuro pode adquirir importância na clínica, evidenciando Ac anti-*E. canis* a partir dos 2-8 dias pós-

exposição e apresentando elevada sensibilidade e especificidade. Contudo, a técnica é laboriosa e demorada. Os resultados com *E. canis* são semelhantes aos obtidos por ELISA, sendo este último método mais adaptável ao diagnóstico clínico (Cárdenas et al., 2007).

A análise por PCR, de elevada especificidade, revelou resultados positivos a partir dos 4-10 dias pós-exposição, antes da ocorrência de seroconversão, em estudos experimentais. Num estudo realizado com quatro animais, infectados experimentalmente com *E. canis*, não houve diferenças entre a sensibilidade de detecção do agente na fase aguda em amostras de sangue ou punção esplênica guiada por ultrasonografia. Contudo, as amostras esplênicas revelaram-se mais sensíveis na detecção da infecção subclínica ou crónica e na avaliação da resposta ao tratamento, do que as amostras sanguíneas ou de medula óssea (Harrus et al., 2004). Em infecções localizadas, pode também ser mais benéfico recolher amostras de líquido sinovial, LCR ou humor aquoso. A análise de punções de medula óssea por PCR, revelou positividade em 10/10 animais com EMC não mielossupressiva e em 5/10 (Siarkou et al., 2007) e 5/19 animais com EMC mielossupressiva, parecendo ser menos sensível nestes casos (Mylonakis et al., 2004).

Tal como nas infecções por *Rickettsia* spp., a cultura destes agentes não é utilizada como meio de diagnóstico na prática clínica.

As lesões macroscópicas *post mortem* de EMC incluem petéquias e equimoses nas superfícies serosas e mucosas da maioria dos órgãos. Durante a fase aguda, observa-se frequentemente linfadenomegália com discoloração acastanhada ou amarelada, esplenomegália com hipertrofia da polpa branca e hepatomegália. A emaciação é verificada nos casos crónicos. A medula óssea apresenta uma coloração vermelha, na fase aguda, e pálida, na fase crónica, devido a discoloração lipídica. Pode ainda verificar-se edema dos membros, ascite e hidropericárdio (Castro et al., 2004; CFSPH, 2005a). Em quase todos os animais verificam-se lesões das meninges, apesar de poucos demonstrarem sinais clínicos de meningite. Um dos achados histopatológicos mais característicos é a ocorrência de um infiltrado plasmocítico e linfocitário perivascular em numerosos órgãos, incluindo os pulmões, cérebro, meninges, rins, linfonodos, medula óssea, baço e por vezes, pele e mucosas, resultando em lesões de vasculite. Esta infiltração parece aumentar nos casos crónicos. Em animais infectados experimentalmente, verificou-se adicionalmente glomerulonefrite crónica e vasculite, caracterizada por infiltração mononuclear intersticial, bem como esteatose hepática e congestão dos sinusóides, igualmente com infiltração mononuclear. As bactérias responsáveis por estas doenças são difíceis de detectar histologicamente, devido aos métodos de fixação e coloração (Castro et al., 2004).

É ainda de salientar que, em animais com infecções consideradas oportunistas, o diagnóstico de erliquiose deve ser sempre considerado na avaliação do estado de imunocompetência, devido às possíveis alterações do sistema imunitário (Greene, 2006).

#### 4.5. Terapêutica

Os fármacos de eleição para as erliquioses caninas são as tetraciclinas, tal como nas infecções por *Rickettsia* spp.. Se a resposta às tetraciclinas for baixa, a probabilidade de existir doenças concomitantes é elevada. A doxiciclina (10 mg/kg, PO, SID a BID, durante 28 dias) e a minociclina (10 mg/kg, PO, BID, durante 28 dias) têm sido utilizadas com maior frequência do que a tetraciclina (22 mg/kg, PO, TID, durante 28 dias) ou a oxitetraciclina (25 mg/kg, PO, TID, durante 28 dias), devido ao facto de serem lipossolúveis, permitindo uma boa capacidade de penetração intracelular. Adicionalmente, como já foi referido, não são afectadas nem afectam a excreção renal. Em casos que a administração por via oral esteja contra-indicada, como por exemplo, na existência de sintomatologia gastrointestinal ou neurológica, a doxiciclina, minociclina ou oxitetraciclina podem ser administradas por via endovenosa. Esta última pode também ser administrada por via intramuscular, utilizando um composto de longa acção (Greene, 2006). Contudo, a administração endovenosa de tetraciclinas é frequentemente associada a tromboflebite, especialmente quando as formas lipossolúveis estão envolvidas. Adicionalmente, a minociclina endovenosa deve ser administrada de forma lenta, pois observou-se hipotensão, choque e urticária em cães que receberam doses rápidas do fármaco. Foi também relatada a ocorrência de anemia e aumento da actividade da ALT, com doses endovenosas de minociclina a 10-20 mg/kg, SID, durante um mês. É ainda de salientar que a administração intramuscular de tetraciclinas é dolorosa e irritante (Allen, Dowling, Smith, Pasloske & Woods, 2004).

A utilização de cloranfenicol (15-25 mg/kg, PO, TID, durante 28 dias) é recomendada em casos de infecções persistentes, após tentativa fracassada de terapêutica com tetraciclinas (Greene, 2006). Contudo, devido aos riscos para a saúde pública associados à utilização de cloranfenicol, cuja exposição pode aumentar o risco de desenvolvimento de anemia aplásica fatal, e à interferência directa na síntese do heme e na produção de medula óssea, deve evitar-se sempre que possível a sua utilização em animais anémicos ou pancitopénicos (Tennant, 2005). Ao contrário da eficácia verificada em *Rickettsia* spp., o tratamento com quinolonas não é eficaz para infecções com *E. canis* nem *E. chaffeensis*, devido a resistência natural a estes fármacos (Maurin, Abergel & Raoult, 2001). Contudo, a espécie *A. phagocytophilum* revelou susceptibilidade *in vitro* às quinolonas, apesar de menor que a verificada com

doxiciclina e rifampicina (Branger, Rolain & Raoult, 2004). O tratamento com dipropionato de imidocarb, por vezes utilizado na EMC, não é eficaz na eliminação do agente (Eddlestone et al., 2006).

A recomendação da duração do tratamento para infecções por *E. canis* é de 28 dias (Neer et al., 2002). Contudo, na EGC, AGC e ATC, o tratamento é eficaz com intervalos mais curtos, sendo recomendada uma duração de 10 dias para a doxiciclina e minociclina, e de 14-21 dias para a tetraciclina e o cloranfenicol (Greene, 2006).

Recentemente, foi realizado um estudo com infecção experimental, para avaliar a eficácia da doxiciclina na eliminação da infecção subclínica e crónica por *E. canis*, devido a relatos anteriores de possível ineficácia, com o esquema terapêutico actualmente recomendado. Foi verificada a recuperação da trombocitopenia e eliminação do agente no sangue, medula óssea, baço, fígado e pulmões de todos os nove animais tratados, através da avaliação de resultados obtidos por PCR (Eddlestone et al., 2007). Paralelamente, foi realizado outro estudo com quatro animais infectados por ixodídeos e tratados na fase subclínica também com doxiciclina, mas apenas durante duas semanas. Após o tratamento todos os animais permaneceram PCR positivos em amostras do *buffy coat*, sendo igualmente capazes de infectar ninfas de *R. sanguineus*, infecção que permaneceu na fase adulta dos ixodídeos (Schaefer et al., 2007). Adicionalmente, foi sugerida a redução da duração do tratamento para 16 dias, na fase aguda da infecção, uma vez que não foi detectado ADN de *E. canis* em nenhum dos quatro animais experimentalmente infectados, após este período de tratamento. Os argumentos para redução da duração do tratamento incluem diminuição dos custos, da probabilidade de efeitos secundários e do risco de resistência ao antibiótico (Harrus et. al, 2004). Contudo, a dificuldade de distinção clínica entre infecção aguda e crónica em infecções naturais, pode tornar esta sugestão difícil de seguir.

Em animais desidratados deve realizar-se fluidoterapia e nos animais severamente anémicos, é importante proceder-se a transfusão sanguínea. A utilização de glucocorticóides em doses imunossupressoras, como prednisolona a 2 mg/kg, durante 2-7 dias pode ser benéfica no período inicial do tratamento, em presença de trombocitopenia severa, devido ao carácter parcialmente imunomediado que esta adquire. A corticoterapia pode ser também benéfica no manejo de outras condições imunomediadas que ocorrem na erliquiose, como a poliartrite, vasculite, meningite e complicações oculares.

A monitorização da resposta ao tratamento nas erliquioses é importante, devido à possibilidade de infecção persistente. A resolução da trombocitopenia é o acontecimento mais rápido, podendo ocorrer entre 7-10 dias pós-tratamento. Geralmente, a contagem plaquetária atinge valores normais aos 14 dias. Estes valores devem ser reavaliados 1-3 meses após o fim

do tratamento. Em alguns casos, a trombocitopénia pode persistir por mais tempo, demorando meses a um ano a resolver (Heeb et al., 2003). A hiperglobulinémia pode levar 6-12 meses a resolver (Greene, 2006).

Nos animais cujos sinais clínicos e laboratoriais foram resolvidos, com permanência de elevados títulos de Ac após o tratamento, pode ser realizada uma análise por PCR, para distinguir entre animais tratados e com infecção persistente. Neste caso a amostra deve ser colhida duas semanas após o término da antibioterapia. Devido à possibilidade de sequestração no baço, é mais fidedigno submeter uma amostra de punção esplénica, como já referido no ponto anterior. Todavia, há a possibilidade de resultados positivos em amostras esplénicas se deverem a ADN de organismos não viáveis e por isso, não representarem infecção activa (Neer et al., 2002).

O tratamento de animais seropositivos assintomáticos é controverso. Por um lado, estes podem servir de reservatório para o agente etiológico e há a possibilidade de progredirem para a fase crónica da doença. Por outro lado, o tratamento indiscriminado destes animais pode resultar teoricamente em desenvolvimento de resistências às tetraciclina, embora esta resistência ainda não tenha sido relatada.

#### **4.6. Prognóstico**

Na maioria dos animais com EMC, em fase aguda ou numa fase crónica ligeira, ocorre geralmente uma recuperação clínica notável entre 24-48 horas, após o tratamento com tetraciclina. Quanto mais cedo é iniciado o tratamento, mais favorável é o prognóstico e recuperação. Nos animais com sintomatologia neurológica o tratamento pode ser menos eficaz, sendo possível uma recuperação mais demorada e a ocorrência de alterações neurológicas irreversíveis (CFSPH, 2005a). A resposta ao tratamento das alterações oculares, verificadas em casos de EMC, é boa em 55,5-85,3% dos casos (Leiva et al., 2005; Komnenou et al., 2007).

O prognóstico na forma crónica e severa da doença é grave, podendo ser difícil resolver alterações inflamatórias multi-sistémicas ou mielossupressão. A morte pode ocorrer devido a infecções secundárias, hemorragias incontroláveis, ou ambas. Assim, é imprescindível identificar a doença antes que os animais entrem nesta fase. Num estudo retrospectivo de EMC crónica mielossupressiva, todos os 10 animais aos quais foi instituída antibioterapia e terapia de suporte, acabaram por morrer. Na experiência destes autores, as raças pequenas na Grécia têm um prognóstico a longo prazo superior, em comparação com raças grandes, quando se apresentam com sinais clínicos e hematológicos idênticos (Mylonakis et al., 2004).



Nos animais cronicamente afectados, com pancitopénia severa ou anemia aplásica, a regeneração da medula óssea pode durar até 120 dias após o tratamento (Breitschwerdt, 2007a).

Recentemente, foi avaliada a presença de indicadores de prognóstico na EMC, em 40 animais. Nos animais que sucumbiram à doença, verificou-se uma prevalência significativamente maior de fraqueza, mucosas pálidas, tendências hemorrágicas, petéquias e equimoses, em comparação com os sobreviventes. Os valores do HT, contagem leucocitária e plaquetária, foram significativamente mais baixos no primeiro grupo, considerando-se a pancitopénia pronunciada (leucócitos  $< 4 \times 10^3/\mu\text{L}$ , HT  $< 25\%$  e plaquetas  $< 50 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) como um factor de risco para a mortalidade. Foi verificada uma probabilidade de 100% de mortalidade nos casos em que se verificou leucopénia severa (leucócitos  $< 0,93 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), anemia severa (HT  $< 11,5\%$ ), TTPA  $> 18,25$  segundos, ou hipocaliémia com valores de potássio inferiores a 3,65 mmol/L (Shipov, Klement, Reuveni-Tager, Waner & Harrus, 2008).

Relativamente à EGC e à AGC, nunca foram relatadas mortes em canídeos. Na AGC, o potencial dos canídeos permanecerem portadores crónicos assintomáticos, quando não tratados, foi verificado experimentalmente, havendo possibilidade de recrudescência da infecção latente e de transmissão do agente. É desconhecido se este estado se verifica em animais tratados (Greene, 2006).

#### **4.7. Prevenção**

Os meios primários de prevenção consistem na quimioterapia, quimioprofilaxia e controlo de vectores, não existindo vacina disponível até à data. A recuperação da doença não se equaciona com o desenvolvimento de imunidade permanente, após a eliminação terapêutica de *E. canis*, podendo ocorrer nova infecção. Contudo, verificou-se experimentalmente o desenvolvimento de imunidade parcial, com atenuação da sintomatologia após reinfecção com estirpes homólogas, mas não com estirpes heterólogas. Nas infecções por *A. phagocytophilum* parece também verificar-se susceptibilidade à reinfecção (Greene, 2006).

Num estudo efectuado em África, compreendendo duas áreas endémicas de erliquiose por *E. canis*, foi aplicado mensalmente o acaricida fipronil a 10% sob a forma de unção punctiforme (*spot on*), durante um ano em canídeos residentes em dois canis, previamente seronegativos a *E. canis*, com proveniência de áreas não endémicas. Durante o tratamento, verificou-se uma seroprevalência significativamente reduzida nestes animais (2,7-5,5%), devido à eliminação do vector *R. sanguineus*, e foi calculada uma taxa de protecção de 96,4%, não tendo sido observada doença clínica. Nos animais não tratados de outros canis e casas particulares a

seroprevalência registada variou entre 21,7% e 100%. Os canis em que não houve controlo de vectores foram os locais com maior seroprevalência registada (100%), tendo sido verificado, no ano anterior ao estudo, uma mortalidade associada a EMC de 44,4-75%. Durante o estudo, a morbilidade nestes canis, presumivelmente associada à doença foi de 22,2-30,8% (Davoust et al., 2003).

Noutro estudo, a aplicação de uma unção punctiforme de permetrina 50%/ imidaclopride 10%, durante sete meses em animais residentes em dois canis de uma área endémica do sul da Itália, previamente negativos a *E. canis*, por meio de avaliação serológica e por PCR, revelou-se igualmente eficaz na prevenção da doença, revelando uma taxa de protecção entre 95,57-100%. A incidência da seropositividade ao agente variou entre 0-1,13% nos animais tratados, em comparação com 13,08-13,40% nos animais controlo (Otranto et al., 2008).

A utilização de doxiciclina (3 mg/kg, PO, SID) ou tetraciclina (8 mg/kg, PO, SID) em animais alojados em canis, como fármaco profiláctico contra *E. canis*, foi validada como eficaz. Contudo, como já foi referido, o seu uso indiscriminado em todos os animais pode resultar em resistência, aumentando o risco para a saúde pública (Davoust, Keundjian, Rous, Maurizi & Parzy, 2005). Para evitar esta situação deve proceder-se a um programa de controlo de vectores, associado a serodiagnóstico por IFI, para identificar os animais previamente expostos. De seguida deve proceder-se ao tratamento dos animais infectados e, nos animais recém-chegados, realizar IFI, profilaxia acaricida e isolamento, até que se conheçam os resultados. Se estas medidas forem tomadas, é possível inibir o ciclo da infecção por *E. canis*, uma vez que não ocorre transmissão transovárica em *R. sanguineus*. Este vector tem um papel importante na manutenção da infecção em canis, pois alimenta-se preferencialmente em canídeos em todas as fases biológicas e é endofílico (Greene, 2006).

#### **4.8. Implicações para a Saúde Pública**

Existem várias espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* com potencial zoonótico. O primeiro caso de erliquiose humana na Europa foi documentado em Portugal, por Morais, no ano de 1991. A erliquiose monocitotrópica humana é provocada por *E. chaffeensis*, e ocorre nos EUA, tendo sido também relatada em África, América do Sul, Ásia, México e Europa (WHO, 2004). Esta espécie causa doença aguda com sintomas de febre, dores de cabeça, mal-estar e também mialgia, náusea e anorexia. Embora os reservatórios silváticos sejam mais importantes, o cão pode servir como portador assintomático em regiões endémicas, podendo transportar os ixodídeos infectantes para a proximidade dos humanos (Shaw & Day, 2005).

Na Venezuela, foi isolada uma estirpe de *E. canis* em 6 de 20 humanos com sintomas compatíveis com erliquiose monocitotrófica humana, bem como em indivíduos assintomáticos (Perez, Bodor, Zhang, Xiong & Rikihisa, 2006), na população canina local e em ixodídeos *R. sanguineus*, sugerindo-se assim que a espécie canina poderá constituir reservatório para a infecção humana, sendo o ixodídeo *R. sanguineus* o vector (Unver, Perez, Orellana, Huang & Rikihisa, 2001). Esta mesma estirpe foi identificada na Grécia, em 100% de 20 cães com sintomatologia de EMC, demonstrando a sua presença na Europa. Foi ainda identificada no Brasil, Tailândia e Turquia. Nesta última localização, a estirpe era 100% idêntica a uma estirpe ovina, evidenciando um aumento dos hospedeiros potenciais para *E. canis* (Siarkou et al., 2007).

O agente da erliquiose granulocitotrófica humana é *E. ewingii*, identificado nos EUA e principalmente em pessoas do sexo masculino e imunodeprimidas, não tendo sido documentadas mortes até à data. *A. phagocytophilum* é a espécie responsável pela anaplasmose granulocitotrófica humana, identificada em pacientes dos EUA, Europa (Shaw & Day, 2005) e do Médio Oriente (WHO, 2004), estando associada a mortalidade apenas em casos complicados por infecções oportunistas. Estas espécies induzem infecções de menor severidade do que a espécie monocitotrófica, desconhecendo-se o potencial dos canídeos constituírem um risco zoonótico (Greene, 2006). Estes podem agir directamente como sentinelas para a infecção nos humanos, nomeadamente no caso da infecção por *A. phagocytophilum*, cujos vectores infectam um largo espectro de hospedeiros (Shaw et al., 2001).

*N. sennetsu* é a bactéria responsável pela febre Sennetsu, doença muito rara e geralmente benigna, com ocorrência no Japão e Malásia (WHO, 2004).

## **5. Estudos de prevalência e perigos potenciais em co-infecções**

Considera-se necessário referenciar de seguida alguns estudos europeus, especialmente de países mediterrânicos, nos quais se avaliou a prevalência de infecção transmitida por vários vectores, de modo a conhecer a situação global, sem dispersar os dados pelos capítulos anteriores.

Na região do Algarve, foi verificada a seroprevalência por IFI em 400 animais, divididos igualmente pelas estações do ano. Os resultados foram os seguintes: 38,5% para *R. conorii*; 5,25% para *E. canis*; e 2,25% para *Borrelia burgdorferi*. Não houve diferenças significativas entre as várias estações. Os factores de risco para a seropositividade a *R. conorii* foram idade superior a dois anos, sexo feminino e pelagem curta. No caso de *E. canis*, os principais

factores de risco foram a aptidão caça, a residência em áreas rurais e o passeio em zonas de baldio. Em 55 canídeos sintomáticos, 51% revelaram seropositividade por IFI a *R. conorii*, 20% a *E. canis* e 13% a estes dois agentes em simultâneo, ao passo que por PCR, com amostras de *buffy coat*, 16,3% foram positivos a *Rickettsia* spp. e 25,4% a *E. canis*, não se verificando co-infecções entre estes organismos. Todos os 188 ixodídeos recolhidos pertenceram à espécie *R. sanguineus*, observando-se através de PCR, uma prevalência de infecção de 22,2% por *Rickettsia* spp. e de 2,2% por *E. canis* (Alexandre, 2005). A seroprevalência verificada no canil municipal de Setúbal, em 104 animais, revelou percentagens de 85,6% para *R. conorii*, 50% para *E. canis*, 4,8% para *C. burnetii* e 26,9% para *Rickettsia typhi* (Bacellar et al., 1995).

Entre 2001 e 2002, foi analisada em Espanha a prevalência de infecção em 466 cães das regiões de Barcelona (n=50), Tarragona (n=116) e Maiorca (n=300), dos quais 206 clinicamente doentes e 260 clinicamente saudáveis. Os resultados foram os seguintes: *R. conorii* (56,4%), *Leishmania infantum* (38%), *Bartonella henselae* (16,8%), *E. canis* (16,7%), *A. phagocytophilum* (11,5%), *Bartonella vinsonii berkhoffii* (1,07%), *Dirofilaria immitis* (0,6%) e *B. burgdorferi* (0,6%). Utilizou-se IFI para a pesquisa de Ac de todos os agentes, à excepção de *L. infantum*, em que se utilizou o método de ELISA para pesquisa de Ac, e de *D. immitis* e *B. burgdorferi*, em que se utilizou ELISA rápido para a pesquisa de Ag e Ac, respectivamente. Apenas 16,3% dos animais foram negativos a todos os testes de diagnóstico. A detecção de Ac anti-*R. conorii* foi associada com seropositividade a *E. canis* e *A. phagocytophilum*, com o sexo masculino e com anemia. A detecção de Ac anti-*E. canis* foi associada com seropositividade a *A. phagocytophilum*. A seropositividade a esta última espécie foi associada com permanência no exterior. A detecção de Ac de *L. infantum* foi associada com doença clínica e permanência no exterior. De resto, não se verificaram associações estatisticamente significativas entre os sinais clínicos, raça, sexo, altura do ano, estilo de vida e exposição a pulgas ou ixodídeos (Solano-Gallego et al., 2006a).

Os dados de três estudos realizados na Sicília são evidenciados de seguida, na Tabela 3, tendo sido realizadas provas de IFI e PCR, para a pesquisa de vários agentes etiológicos transmitidos por ixodídeos. Nestes estudos, não foram discriminados os animais saudáveis dos doentes, nem associados factores de risco (Torina & Caracappa, 2006).

A infecção simultânea, com mais do que um agente patogénico, pode ter implicações importantes na apresentação clínica, diagnóstico, terapêutica e prognóstico do paciente individual, sendo importante caracterizar estas influências, de modo a conhecer potenciais co-infecções. Existem indicações de que cães com elevada exposição a ixodídeos podem ser sujeitos a uma elevada taxa de infecção concomitante com múltiplos agentes, potencialmente

zoonóticos. Experimentalmente, a infecção concomitante com *E. canis* e *B. canis* pode resultar numa potenciação das manifestações clínicas, levando a variabilidade na apresentação clínica típica (Kordick et al., 1999). A infecção por agentes transmitidos por ixodídeos pode ainda ser complicada por outras doenças transmitidas por vectores, como leishmaniose ou dirofilariose (Shaw et al., 2001), tendo sido verificada uma diminuição evidente na agregação plaquetária em animais naturalmente co-infectados com *L. infantum* e *E. canis*, em comparação com animais infectados apenas por um destes agentes, bem como no grupo de controlo (Cortese et al., 2006).

**Tabela 3** – Prevalência de vários agentes transmitidos por ixodídeos, observada em três estudos realizados na Sicília, Itália (Torina & Caracappa, 2006)

Espécie	IFI			PCR		
	Número total de animais	Casos positivos	Prevalência (%)	Número total de animais	Casos positivos	Prevalência (%)
<i>A. phagocytophilum</i>	259	88	33,98	112	4	3,57
<i>B. canis</i>	565	41	7,26	18	5	27,78
<i>T. microti</i>	3	0	0	-	-	-
<i>C. burnetii</i>	101	26	25,74	-	-	-
<i>E. canis</i>	3548	1218	34,33	70	0	0
<i>R. conorii</i>	2133	1532	71,82	-	-	-
<i>R. rickettsii</i>	32	0	0	-	-	-
<i>Rickettsia</i> spp.	-	-	-	155	10	6,45
<i>Anaplasma</i> / <i>Ehrlichia</i>	-	-	-	36	14	38,89
<i>Babesia</i> spp.	-	-	-	8	0	0

## 6. Controlo de vectores

Como foi referido nos capítulos anteriores, o controlo de vectores permanece o meio mais eficaz de prevenção para estas doenças. Este controlo é particularmente fulcral nos casos de movimentação de canídeos não expostos, para áreas endémicas, ou quando participam em actividades onde a exposição a ixodídeos possa ser elevada (Shaw et al., 2001).

De seguida, salientam-se a ocorrência ao longo do ano e os principais *habitats* dos ixodídeos existentes em Portugal (Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, 2008), com maior importância na transmissão dos agentes patogénicos referidos nesta dissertação.

O ixodídeo *R. sanguineus*, conhecido como carraça castanha do cão, tem este como hospedeiro primário, podendo alimentar-se nele durante todas as fases do seu ciclo de vida. Infesta canis e habitações domésticas com frequência, e a sua actividade pode verificar-se durante todo o ano, sendo contudo mais intensa desde o fim da Primavera ao início do Outono, nas zonas temperadas (Dantas-Torres, 2008).

A espécie *I. ricinus*, ixodídeo de três hospedeiros, conhecido como carraça dos ovinos, é encontrada nas pastagens, bosques ou matas. Os estádios de larva e ninfa alimentam-se primariamente em pequenos mamíferos e aves, enquanto que os adultos se alimentam em cervídeos e ruminantes domésticos. A sua actividade aumenta na Primavera e no Outono, alargando-se aos Invernos mais húmidos e quentes, podendo a alimentação ocorrer durante períodos extensos do ano (Shaw e Day, 2005).

O ixodídeo *I. hexagonus*, igualmente de três hospedeiros, encontra-se distribuído por ambientes periurbanos, em abrigos e canis, sendo conhecido como carraça do ouriço-cacheiro, que tem o papel de hospedeiro primário. Esta é a segunda espécie encontrada com maior frequência, em canídeos domésticos na Europa. A sua actividade pode verificar-se desde o início da Primavera ao fim do Outono, mas é mais prevalente nos meses de Abril e Maio. O ixodídeo *D. reticulatus* encontra-se principalmente em áreas arborizadas e é uma espécie de três hospedeiros. Os adultos parasitam equídeos, ruminantes e suídeos, quer domésticos, quer silváticos, e os estádios imaturos parasitam roedores, canídeos e ocasionalmente, aves, com maior actividade entre meados do Verão ao fim do Outono (Wall & Shearer, 2001). Estes dados servem para enfatizar a necessidade de realizar um controlo contínuo ao longo do ano.

Os animais devem ser inspeccionados diariamente para detectar a presença de ixodídeos, particularmente durante a Primavera e Verão. As principais áreas de fixação são os pavilhões auriculares, face, pescoço e áreas interdigitais. As larvas e ninfas podem ser também encontradas ao longo do dorso. Os ixodídeos devem ser removidos com o auxílio de pinças próprias para o efeito e luvas, devendo evitar-se a rotação e esmagamento durante a remoção (Shaw & Day, 2005). É de salientar que certas técnicas de remoção de ixodídeos, como a utilização de parafina ou fósforos quentes, podem aumentar o risco de infecção, por estimularem a libertação adicional de saliva pelo vector (CFSPH, 2005b).

A erradicação destes vectores é impossível na maioria das situações, devido ao envolvimento de hospedeiros reservatórios no seu ciclo de vida (Shaw et al., 2001). Adicionalmente, as fases do ciclo de vida que ocorrem fora dos hospedeiros, verificam-se com frequência em localizações inacessíveis, limitando a eficácia do controlo ambiental. Outros problemas associados ao tratamento directo do ambiente, como o desenvolvimento de resistências e de efeitos nos organismos não-alvo, levaram ao desenvolvimento acrescido de produtos tópicos e sistémicos para aplicação nos animais de companhia. Contudo, o tratamento ambiental pode ser necessário em caso de infestações elevadas de *R. sanguineus* em interiores, devido ao seu comportamento marcadamente endofílico (Dantas-Torres, 2008). Muitos dos produtos mais recentes são altamente específicos para artrópodes, resultando numa maior segurança para os mamíferos. Existem vários no mercado, sendo particularmente valiosos aqueles com eficácia

combinada de acaricida e repelente, produzindo efeito antes, ou pouco depois, dos ixodídeos se fixarem (Shaw & Day, 2005).

As preparações tópicas acaricidas encontram-se disponíveis sob várias formas, incluindo unções (*spot on* e *pour on*), sprays, coleiras, champôs e pós. Os princípios activos mais utilizados são: piretróides como a permetrina, deltametrina e cipermetrina; derivados do fenilpirazol, como o fipronil e o piriprol; amitraz e carbaril. É de salientar a possibilidade do desenvolvimento de resistências a estes fármacos profilácticos, que varia conforme a localização geográfica, sendo influenciada pelas más práticas de utilização, como a ausência de rotação de princípios activos e utilização de doses inferiores às recomendadas. O controlo biológico pode vir a tornar-se importante a nível prático, sendo actualmente conhecidas duas espécies de fungos entomopatogénicos, com efeitos nocivos em ninfas e adultos de *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2008).

Num estudo de eficácia comparativa entre uma unção punctiforme de permetrina 50%/imidaclopride 10% *versus* fipronil 10%/(S)-metopreno 12%, em condições naturais de infecção por *R. sanguineus*, compreendendo 45 cães em Itália, durante 56 dias, verificaram-se percentagens semelhantes de eficácia nas formas adultas: 87,5-100% *versus* 88,52-99,89%, respectivamente. Contudo, a eficácia contra as formas imaturas dos ixodídeos foi significativamente maior no primeiro produto: 98,20-99,86%, em comparação com o segundo: 77,40-98,92% (Otranto et al., 2005). Estudos experimentais com *R. sanguineus* indicam que, apesar dos dois produtos terem boa eficácia acaricida, a solução de fipronil/(S)-metopreno parece ter uma eficácia repelente significativamente inferior à da solução de permetrina/imidaclopride (Young, Arther & Davis, 2003; Hostetler, Dryden, Payne & Smith, 2006). Num estudo multicêntrico realizado com 363 animais em França, Itália e Alemanha, para avaliação da eficácia acaricida entre estes dois produtos, em condições naturais de infecção por *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes* spp., durante 28 dias, observaram-se os seguintes resultados: 86-98% para *Rhipicephalus* spp. e 91-98% para *Ixodes* spp., com permetrina/imidaclopride; 81-92% para *Rhipicephalus* spp. e 69-92% para *Ixodes* spp., com fipronil (Hellmann, Knoppe, Krieger & Stanneck, 2003).

O piriprol, derivado recente do fenilpirazol, em unção punctiforme de 12,5%, também se revela eficaz contra a infecção experimental por *R. sanguineus*, tendo sido verificada uma eficácia acaricida entre 88,71-99,68%, num período de 30 dias (Schuele et al., 2008). O novo ectoparasiticida amitraz/metaflumizona a 20mg/kg, em unção punctiforme, revela boa eficácia acaricida, variando entre 86,5-100%, num período de 28 dias, em infecção experimental por *R. sanguineus*. Contudo, o seu efeito residual é inferior ao verificado com a formulação de fipronil/(S)-metopreno (Rugg, Hair, Everett, Cunningham & Carter, 2007). A eficácia

comparativa entre estes dois produtos foi realizada igualmente em condições naturais de infecção por *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes* spp., num estudo multicêntrico na Alemanha e em França, com 181 animais, durante 56 dias, observando-se os seguintes valores de eficácia: 97,3-99,7% para *Rhipicephalus* spp. e 88,4-96,5% para *Ixodes* spp., com amitraz/metaflumizona; 76,9-89,2% para *Rhipicephalus* spp. e 77,6-84,4% para *Ixodes* spp., com fipronil. É de salientar que em 12 de 293 animais tratados com amitraz/metaflumizona, foram observados efeitos adversos como vômito, diarreia, bradicardia, hipotermia, letargia, inapetência, prurido, pústulas no abdómen, e efeitos relacionados com o local de aplicação (mancha negra na pele, pelagem oleosa, seborreia seca, e odor desagradável), contudo ligeiros e transitórios (Hellmann et al., 2007).

A utilização de deltametrina a 4% sob a forma de coleira, revela uma eficácia acaricida elevada durante cerca de 5,5 meses, entre 90-100% para *R. sanguineus* e 95,4-100% para *I. ricinus*, mas apenas após a primeira semana de aplicação, devido à lenta libertação do princípio activo (Van Den Bos & Curtis, 2002). A deltametrina em forma de champô a 0,07%, revelou igualmente eficácia acaricida elevada, em condições experimentais de infecção por *R. sanguineus*, variando entre 92,1-100%, durante 18 dias (Franc & Cadiergues, 1999).



## **II. Estudo das parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos, observadas no Hospital Escolar da FMV – UTL, no período de Setembro de 2007 a Janeiro de 2008**

Este estudo englobou as doenças causadas por *Rickettsia* spp., *Babesia canis*, *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma platys*, pelo que o termo parasitoses foi aqui utilizado *sensu lato*.

### **1. Materiais e métodos**

A componente prática da presente dissertação incide na análise de uma população canina, constituída por 28 animais de ambos os sexos (Tabela 4), apresentados à consulta durante o período de estágio curricular no Hospital Escolar da FMV e cuja pesquisa por IFI (n=26), PCR (n=1) ou microscopia (n=1), evidenciou exposição prévia a um ou mais agentes transmitidos por ixodídeos. De modo a caracterizar esta população foram recolhidos dados através de um inquérito realizado aos proprietários dos animais (Anexo 3), em conjunto com dados dos registos clínicos, permitindo a obtenção de informação relativa às características do animal, aptidão, tipo de alojamento, acesso ao exterior, profilaxia realizada para ectoparasitas e para doenças transmitidas por ixodídeos, doenças concomitantes, exame físico, exames complementares de diagnóstico, terapêutica instituída e resposta à mesma.

A pesquisa dos agentes etiológicos por IFI foi realizada em um de dois laboratórios externos: o “Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne” (Echevarne), em Barcelona, Espanha; e o laboratório “DNAtech – Investigação Científica e Análises Moleculares, Lda.” (DNAtech), em Lisboa, Portugal. No primeiro laboratório consideram-se os seguintes títulos de Ac, como limiares de positividade: *Babesia canis* – 20; *Ehrlichia* sp. – 80; *Rickettsia* spp. – 40. No segundo laboratório os limiares de positividade são: *Babesia canis* – 32; *Ehrlichia canis* – 50; *Rickettsia conorii* – 40. Enquanto que no laboratório Echevarne são realizadas titulações adicionais de Ac até certa diluição (80 para *B. canis*, 320 para *Ehrlichia* sp. e 640 para *Rickettsia* spp.), no laboratório DNAtech apenas é realizada uma titulação adicional de Ac anti-*R. conorii*, em diluição de 1/80.

A análise por PCR foi realizada para *Rickettsia* sp. no laboratório DNAtech e a pesquisa por microscopia foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da FMV, em esfregaço sanguíneo.

Adicionalmente, foram realizadas outras análises complementares nos laboratórios da FMV, incluindo hemogramas, análises bioquímicas, urianálises, análises citológicas, histopatológicas e análises de IFI para *Leishmania* sp.. Nos dois laboratórios externos referidos no parágrafo anterior foram também realizadas análises de IFI ou PCR para *Leishmania* sp., bem como provas de coagulação.

A análise de dados foi realizada com base em métodos de estatística descritiva (média, desvio padrão, moda, mediana, frequência absoluta e frequência relativa), utilizando o programa Microsoft® Excel.

**Tabela 4** – Identificação, sexo, idade e positividade a agentes transmitidos por ixodídeos, na população estudada

Nome	Sexo	Idade (anos)	<i>B. canis</i>		<i>Ehrlichia</i> sp. / <i>E. canis</i>		<i>Rickettsia</i> spp. / <i>R. conorii</i>	
			+/-	Título	+/-	Título	+/-	Título
Amstrong	m	8	nr		nr		+	PCR
Becas	f	10	-		-		+	320
Billy	m	10	- fb		- fb		+	40
Boni	f	13	nr		+ <sup>A</sup>	Microscopia	nr	
Buguie	m	1	+	≥ 32	- *		-	
Evee	f	7	+	80	+	160	+	80
Filipe	m	4	-		-		+	320
Flota	m	10	- fb		+	≥ 50	+	40
Maggie	f	6	-		-		+	80
Mara	f	11	+	≥ 32 <sup>fr</sup>	+	≥ 50	+	40
Max	m	5	+	> 80	-		+	640
Nico	m	14	+	20	+	320	+	80
Nina	f	7	+	20	-		-	
Pibe	m	10	+	≥ 32	+	≥ 50 <sup>fr</sup>	+	40
Portus	m	9	-		+	> 320	+	160
Rex	m	10	-		+	160	nr	
Rufus	m	4	+	≥ 32 <sup>fr</sup>	-		+	≥ 80
Sebastião	m	14	+	> 80	-		+	40
Stromp	m	7	nr		nr		+	160
Susy	f	7	-		+	> 320	+	320
Tattoo	m	11	- fb		-		+	40
Tusca	f	13	-		-		+	≥ 80
Vega	f	9	+	20	-		+	320
Willy	m	6	nr		nr		+	320
Yara R	f	4	+	> 80	-		-	
Yara V	f	11	+	≥ 32 <sup>fr</sup>	+	≥ 50	+	≥ 80
Zarco	m	10	+	≥ 32	- fb		+	≥ 80
Zorba	m	8	+	20	+	> 320	+	80

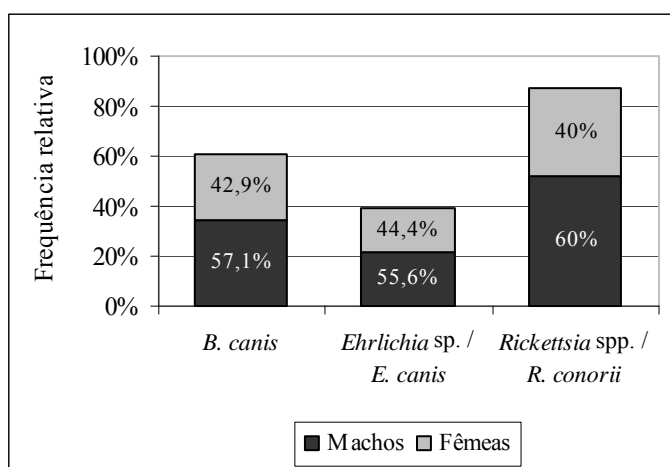
**Legenda:** (+) – positivo; (-) – negativo; A – *A. platys*; f – feminino; fb – fluorescência basal; fr – título fraco; m – masculino; nr – não realizado; \* – positivo, através de teste por imunomigração rápida, três semanas antes da análise por IFI.

## 2. Resultados

### 2.1. Prevalências dos agentes etiológicos

Na totalidade da população foi verificada positividade em 88,5% (23/26) animais para *Rickettsia* sp., 58,3% (14/24) para *B. canis*, 41,7% (10/24) para *Ehrlichia* sp. e 100% (1/1) para *A. platys*. A distribuição dos casos entre os meses do ano foi equivalente durante todo o período. Nos cães (n=23) cuja IFI foi realizada para todos os agentes, as seroprevalências obtidas foram as seguintes: 87,0% para *Rickettsia* sp., 60,9% para *B. canis* e 39,1% para *Ehrlichia* sp. (Gráfico 1). Destes, 26,1% e 34,8% dos animais revelaram seropositividade a três e dois agentes em simultâneo, respectivamente. Nenhum animal foi positivo apenas a *Ehrlichia* sp., mas 26,1% e 13,0% dos animais revelaram seropositividade apenas a *Rickettsia* sp. ou a *B. canis*, respectivamente. Na Tabela 5, os animais seropositivos são distribuídos por título de Ac, nos casos em que foi possível obter uma quantificação deste.

**Gráfico 1** – Frequência relativa de positividade por agente etiológico e por sexo em 23 soros de cães analisados por IFI



**Tabela 5** – Distribuição dos cães seropositivos por título de anticorpos

Título	% <i>B. canis</i> (n=8)
20	50
80	12,5
> 80	37,5

Título	% <i>Ehrlichia</i> sp. (n=6)
160	33,3
320	16,7
> 320	50

Título	% <i>Rickettsia</i> spp. (n=18)
40	33,3
80	22,2
160	11,1
320	27,8
640	5,6

### 2.2. Caracterização da população em estudo

Na totalidade da população, 61% (17/28) dos indivíduos eram do sexo masculino e 39% (11/28) do sexo feminino, compreendendo idades entre 1 e 14 anos, com média de 8,5 anos e moda de 10 anos. Apenas um animal (4%) tinha idade inferior a 4 anos, enquanto que em 50% (14/28) se verificaram idades compreendidas entre 4-9 anos e em 46% (13/28), idade igual ou superior a 10 anos. Nas Tabelas 6 e 7 são mencionadas a aptidão e a raça, bem como o tipo de pelagem dos animais, respectivamente.

**Tabela 6** – Caracterização da população estudada de acordo com a aptidão e a raça

	n (%)
<b>Aptidão</b>	
Companhia	25 (89)
Guarda	3 (11)
<b>Raça</b>	
Determinada	20 (71)
Importada	18 (64)
Nacional	2 (7)
Indeterminada	8 (29)
<b>Discriminação das raças</b>	
Boxer	4 (14)
Cocker Spaniel	3 (11)
Retriever do Labrador	3 (11)
Caniche	2 (7)
Dobermann	1 (4)
Epagneul Pequês	1 (4)
Golden Retriever	1 (4)
Pit Bull Terrier	1 (4)
Podengo Português	1 (4)
Rafeiro do Alentejo	1 (4)
Rottweiler	1 (4)
Schnauzer	1 (4)
Indeterminada	8 (29)

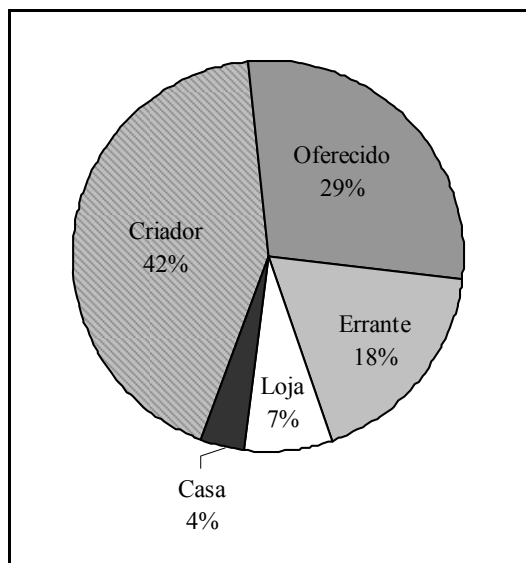
**Tabela 7** – Caracterização da pelagem dos animais estudados

	n (%)
<b>Comprimento</b>	
Curta	15 (54)
Média	9 (32)
Comprida	4 (14)
<b>Tipo</b>	
Lisa	24 (86)
Encaracolada	2 (7)
Cerdosa	2 (7)
<b>Cor</b>	
Amarela	7 (25)
Fulva	6 (21)
Preta	5 (18)
Tigrada	3 (11)
Castanha	3 (11)
Branca	2 (7)
Castanha e preta	1 (4)
Sal e pimenta	1 (4)

Uma percentagem de 57% (16/28) dos animais não apresentava qualquer doença do foro dermatológico ou com repercussões cutâneas que, hipoteticamente, pudesse facilitar ou dificultar a fixação dos ixodídeos. Oito animais (29%) eram seropositivos a *Leishmania* sp., dos quais pelo menos quatro indivíduos manifestavam algum tipo de lesão cutânea, incluindo liquenificação, seborreia, erosões, úlceras, piodermite crónica e dermatite piogranulomatosa. Dois dos animais com leishmaniose tinham também, respectivamente, mastocitoma focal e história de dermatite por alergia alimentar. Adicionalmente, outros animais apresentavam: a) dermatite crónica secundária a lambadura psicogénica; b) dermatite recorrente a *Malassezia* spp. e história de dermatite alérgica, compatível com dermatite alérgica à picada de pulga (DAPP) ou alergia alimentar; c) DAPP, mastocitoma focal e uma lesão infectada de carácter piogranulomatoso; d) lesões nodulares, cuja etiologia não foi determinada.

No Gráfico 2 são expostos os resultados relativos à proveniência dos cães estudados. Uma percentagem de 86% (24/28) dos animais estava na posse dos proprietários desde cachorro (menos de 3 meses de idade), enquanto que 11% (3/28) só a partir dos 5-12 meses de idade e 4% (1/28), somente desde os 14 anos, idade aproximada com a qual foi recolhido da rua. Relativamente à zona de residência, 57% (16/28) viviam em zonas urbanas, 32% (9/28) em zonas periurbanas e 11% (3/28) em zonas rurais. A distribuição por distrito e concelho de residência é realizada na Tabela 8.

**Gráfico 2** – Resultados do tipo de proveniência dos cães em estudo



**Tabela 8** – Distribuição da população estudada por distrito e concelho de residência

	n (%)
<b>Lisboa</b>	<b>22 (79)</b>
Lisboa	5 (18)
Loures	5 (18)
Cascais	3 (11)
Oeiras	3 (11)
Mafra	2 (7)
Sintra	2 (7)
Amadora	1 (4)
Odivelas	1 (4)
<b>Setúbal</b>	<b>3 (11)</b>
Almada	2 (7)
Sesimbra	1 (4)
<b>Castelo Branco</b>	<b>2 (7)</b>
Castelo Branco	2 (7)
<b>Santarém</b>	<b>1 (4)</b>
Santarém	1 (4)

Doze animais (43%) tinham acesso permanente ao exterior e 25 (89%) tinham acesso a espaços públicos (Tabela 9). No que concerne à deslocação dos cães com os seus proprietários, 68% (19/28) acompanhavam estes em férias ou durante os fins-de-semana, dos quais 53% (10/19) para praia e campo, 26% (5/19) só para campo, 11% (2/19) só para praia e 11% (2/19) para zonas citadinas.

**Tabela 9** – Características do acesso a espaços públicos dos cães estudados (n=25)

	n (%)		n (%)
<b>Modo</b>		<b>Acesso a relvados/descampados</b>	
Solto	10 (40)	Relvados	7 (28)
Trela	9 (36)	Descampados	6 (24)
Ambos	6 (24)	Ambos	10 (40)
		Sem acesso	2 (8)
<b>Número de vezes por dia</b>		<b>Brinca com outros cães</b>	
1-2	7 (28)	Sim	15 (60)
3-4	13 (52)	Não	10 (40)
≥ 5	4 (16)		
Irregular	1 (4)		

Na tentativa de estudar potenciais factores que pudessem incrementar o risco para a saúde pública do agregado familiar, verificou-se, através do inquérito, que 96% (27/28) dos proprietários tinham ouvido falar em “febre da carraça” ou doenças transmitidas por ixodídeos. Porém, três destes proprietários tinham a noção que estas doenças apenas ocorriam em humanos. A presença de crianças ou idosos no agregado confirmou-se em doze casos, dos quais 50% incluíam crianças, 30% idosos e 20% ambos os grupos. Situações de contacto

acrescido entre proprietários e animais verificaram-se nos seguintes casos: 96% (27/28) dos cães brincavam com os donos, 18% (5/28) permaneciam por vezes no colo dos donos e 11% (3/28) dormiam na cama dos donos.

A existência de outros animais na residência confirmou-se em dezassete casos, distribuídos por cães (65%), gatos (35%), aves (18%) e quelónios (6%). Em quatro casos havia história de doenças transmitidas por ixodídeos na família, três deles relativos a família fora do agregado e um relativo ao próprio proprietário, quando criança.

Uma percentagem de 82% (23/28) dos proprietários, já tinha visualizado em algum momento a presença de ixodídeos nos animais. Em seis casos (21%) havia história de presença de ixodídeos pouco tempo antes do diagnóstico ou à apresentação do animal na consulta. Cinco animais apenas tinham sido observados com ixodídeos uma única vez, outros cinco raramente e quatro apenas durante o Verão ou em altura de férias no campo.

O controlo dos vectores, por meio de acaricidas/insecticidas, era realizado por 93% (26/28) dos proprietários, previamente ao diagnóstico. Contudo, apenas 27% destes o fazia de acordo com a regularidade indicada pelo fabricante e ao longo de todo o ano. Verificou-se ainda rotação de produtos ou uso simultâneo de diferentes formas de aplicação em 38% dos casos. Na Tabela 10 são indicadas a frequência de aplicação, a forma de aplicação e o princípio activo utilizado, antes e depois do diagnóstico. No que concerne aos animais sobreviventes, um proprietário passou a fazer controlo de vectores, mas três deixaram de realizar este tipo de prevenção, sob qualquer regime de aplicação. A existência de história anterior de reacções adversas a estes produtos confirmou-se num caso, tendo sido verificada sonolência nas primeiras 48h após a aplicação de uma solução de permetrina/imidaclopride, sob a forma de unção punctiforme.

A imunoprofilaxia para babesiose apenas foi realizada em dois animais (7%), serologicamente negativos a *B. canis*. Um deles fez a primovacinação completa (duas administrações, com um mês de intervalo) no ano de 2005, mas não realizou os reforços anuais subsequentes. O outro animal realizou a primeira administração da primovacinação, um mês antes da pesquisa serológica. Em 43% (12/28) e 46% (13/28) dos casos, não havia conhecimento do estado vacinal para a babesiose e para a doença de Lyme, respectivamente. Relativamente a esta última, os restantes 54% (15/28) nunca tinham sido vacinados.

**Tabela 10** – Distribuição de resultados do inquérito relativos a controlo de vectores, antes e após o diagnóstico

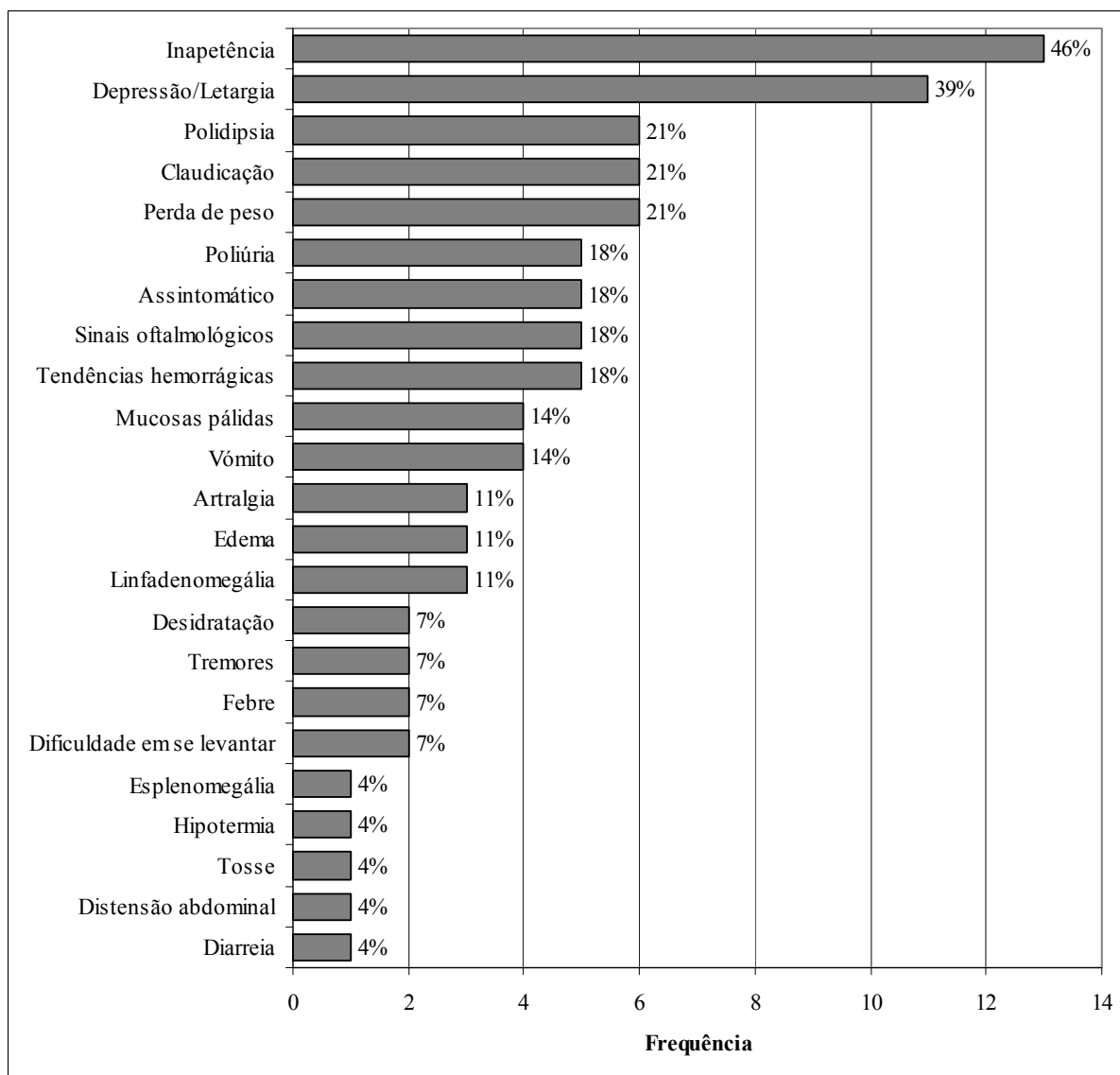
Pré-diagnóstico (n=26)	n (%)	Pós-diagnóstico (n=18)	n (%)
<b>Frequência</b>		<b>Frequência</b>	
Regular durante todo o ano	7 (27)	Regular durante todo o ano	9 (50)
Regular durante a Primavera/Verão	6 (23)	Regular durante a Primavera/Verão	3 (17)
Irregular	13 (50)	Irregular	6 (33)
<b>Forma de aplicação</b>		<b>Forma de aplicação</b>	
Unção punctiforme ( <i>spot on</i> )	20 (77)	Unção punctiforme ( <i>spot on</i> )	12 (67)
Unção contínua ( <i>pour on</i> )	1 (4)	Unção contínua ( <i>pour on</i> )	1 (6)
Coleira	6 (23)	Coleira	3 (17)
Spray	3 (12)	Spray	3 (17)
Champô	2 (8)	Champô	1 (6)
Pó	1 (4)	Pó	1 (6)
<b>Princípio activo</b>		<b>Princípio activo</b>	
Fipronil	16 (62)	Fipronil	8 (44)
Permetrina/Imidaclopride	11 (42)	Permetrina/Imidaclopride	9 (50)
Deltametrina	5 (19)	Deltametrina	3 (17)
Imidaclopride	1 (4)	Imidaclopride	0 (0)
Permetrina	1 (4)	Permetrina	1 (6)
Não sabe	4 (15)	Não sabe	2 (11)

## 2.3. Estudo clínico

### 2.3.1. Sinais clínicos

Os sinais clínicos verificados na população estudada são apresentados no Gráfico 3.

**Gráfico 3** – Frequência absoluta e frequência relativa dos sinais clínicos observados nos 28 cães estudados



Os sinais oftalmológicos incluíram dois casos de conjuntivite, unilateral e bilateral, um caso de corrimento ocular purulento bilateral, um caso de uveíte hipertensiva unilateral (congestão episcleral, hifema, buftalmia e aumento da pressão intra-ocular (PIO)), e um caso de uveíte unilateral (diminuição da PIO) num olho e queratite grave com buftalmia no outro.

As tendências hemorrágicas incluíram um caso de hematoquézia, um caso de hematemese isolada, um caso de hematúria, um caso de hifema, e um caso de hematoquézia isolada e



petéquias nos pavilhões auriculares e na mucosa peniana. O animal deste último caso, pareceu demonstrar alguma dor à palpação do abdômen caudal e o proprietário referiu a existência de tenesmo desde há algum tempo.

Os sinais de edema ocorreram num animal com tumefacção da articulação cárpica, num animal com ascite grave e num animal com história de edema escrotal transitório.

### 2.3.2. Exames complementares

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados relativamente ao hemograma dos animais cuja análise foi realizada previamente à pesquisa etiológica (n=25). Relativamente às alterações da morfologia hematológica, verificou-se a presença de anisocitose eritrocitária (32%), policromasia (20%), eritrócitos nucleados (12%), linfócitos reactivos (16%) e anisocitose plaquetária (8%).

**Tabela 11** – Resultados dos hemogramas de 25 animais, obtidos antes da pesquisa dos agentes etiológicos

Parâmetro (intervalo de referência <sup>1</sup> )	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	% ↓	% ↑
Eritrócitos ( $5,5-8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ )	5,59	1,72	5,78	1,29	8,03	44	0
Hematócrito (37-55 %)	39,16	12,14	40,20	11,60	57,60	44	4
Hemoglobina (12-18 g/dL)	13,04	4,10	13,20	4,32	19,50	40	8
VCM (60-77 fL)	70,61	5,48	70,70	62,90	89,70	0	4
HCM (19,5-24,5 pg)	23,62	2,65	23,90	19,10	33,50	4	24
CHCM (32-36 g/dL)	33,34	1,20	33,34	30,40	37,30	4	4
Plaquetas ( $200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$ )*	116,35	90,18	89,05	14,50	364	85	0
Leucócitos ( $6-17 \times 10^3/\mu\text{L}$ )	16,90	15,69	10,70	3,32	58,60	12	24
Neutrófilos segmentados (3000-11500/ $\mu\text{L}$ )	13260	14361	7575	2590	50208	4	28
Neutrófilos não segmentados (0-300/ $\mu\text{L}$ )	63	231	0	0	1046	-	8
Linfócitos (1000-4800/ $\mu\text{L}$ )	2491	4087	1320	84	20592	36 <sup>p</sup>	8
Monócitos (150-1350/ $\mu\text{L}$ )	706	766	468	0	3516	20	12
Eosinófilos (100-1250/ $\mu\text{L}$ )	377	728	93	0	3516	56	4
Basófilos (raros)	0	0	0	0	0	0	0

**Legenda:** 1 – De acordo com Feldman, Zinkl e Jain (2000); % ↓ – percentagem de animais com o parâmetro diminuído; % ↑ – percentagem de animais com o parâmetro elevado; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; \* – seis animais apresentavam agregação plaquetária; p – um animal estava sob o efeito de prednisolona há 21 dias.

No que concerne à bioquímica sérica, são referidas na Tabela 12 as alterações verificadas.

**Tabela 12** – Alterações dos parâmetros bioquímicos no soro dos animais estudados

Alteração	n/t (%)	Alteração	n/t (%)
Hipoalbuminémia	5/13 (38)	Hipoglicémia ligeira	4/13 (31)
Hiperproteinémia	5/14 (36)	Aumento da ALT	2/20 (10)
Hiperglobulinémia	4/7 (57)	Aumento da FAS	4/10 (40)
Aumento da ureia	9/20 (45)	Hipercaliémia ligeira	1/6 (17)
Aumento da creatinina	3/20 (15)	Hiperclorémia ligeira	1/6 (17)

**Legenda:** n – número de animais em que se verificou a alteração; t – número total de animais testados.

Oito animais realizaram urianálise, registando-se proteinúria (entre 100-300 mg/dL) sem sedimento activo em cinco casos (63%), hematúria/hemoglobinúria (25-200 células/ $\mu$ L) em quatro casos (50%), hematúria microscópica (4-6 eritrócitos/400x) num caso (13%) e piúria (30-35 leucócitos/400x) noutra caso (13%). Em três animais (38%), verificou-se a presença simultânea de proteinúria sem sedimento activo e hematúria/hemoglobinúria.

Os exames radiológicos abdominais, realizados em cinco animais, revelaram dois casos de esplenomegália, um deles com hepatomegália simultânea. Na radiografia da articulação cárpica do animal que apresentava artralgia, tumefacção articular e claudicação, observou-se uma imagem de derrame articular e hipertrofia dos tecidos moles adjacentes, sem outras lesões osteoarticulares aparentes. Posteriormente, foi realizada uma biópsia articular, revelando artrite crónica com hiperplasia da membrana sinovial.

A ultrasonografia abdominal foi realizada em nove animais, observando-se alterações esplénicas em 44%, alterações hepáticas em 33% e alterações renais em 33%. As alterações esplénicas consistiram em lesões multifocais hipoecogénicas e/ou com ecogenicidade mista em dois casos, numa lesão focal de ecogenicidade mista em um caso, e em esplenomegália em dois casos. A nível do parênquima hepático observou-se um caso de lesões multifocais hipoecogénicas, um caso de hiperecogenicidade difusa e um caso de hepatomegália. Nos três animais com alterações da imagem renal, foi verificado um aumento da ureia sérica. A creatinina sérica estava aumentada em dois animais, não tendo sido realizado o seu doseamento no terceiro. Observou-se a presença de um anel hiperecogénico na junção corticomedular em dois casos. Adicionalmente, um destes animais apresentava hiperecogenicidade do córtex renal e aumento da espessura cortical. O aumento da espessura cortical foi igualmente observado num terceiro animal, que também apresentava ascite e hiperecogenicidade difusa do parênquima hepático, bem como do mesentério.

Foi realizada uma ultrasonografia ocular num cão que apresentava uveíte hipertensiva, tendo sido verificada uma grande quantidade de conteúdo no compartimento posterior com alguma flutuação, de ecogenicidade intermédia e homogénea, sugerindo uma imagem de hemorragia do vítreo com algum grau de organização.

Em três casos foram realizadas provas de coagulação, que incluíram a determinação do fibrinogénio, TP e TTPA. A única alteração verificada foi hipofibrinogénemia num animal que apresentava lesões esplénicas multifocais hipoecogénicas, no exame ultrasonográfico. A presença de sangue oculto nas fezes foi verificada num cão que apresentava hemorragias petequiais. Adicionalmente, realizou-se um mielograma que revelou uma medula ligeiramente hiper celular, sem alterações na proporção entre as linhas celulares.

### 2.3.3. Doenças concomitantes

Há excepção de sete animais (25%), os restantes 21 cães apresentaram doenças concomitantes, aquando da pesquisa dos agentes transmitidos por ixodídeos (Tabela 13).

**Tabela 13** – Presença de doenças concomitantes nos animais submetidos a pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos

Doença	n (%)
Leishmaniose	8 (29)
Neoplasia	7 (25)
Mastocitoma cutâneo	2 (7)
Histiocitoma fibroso maligno multicêntrico com localização primária no baço	1 (4)
Linfoma multicêntrico	1 (4)
Neoplasia das glândulas hepatóides	1 (4)
Neoplasia testicular compatível com sertolinoma	1 (4)
Neurofibrossarcoma do plexo braquial	1 (4)
Dermatite	4 (14)
Dermatite alérgica à picada de pulga	1 (4)
Dermatite por <i>Malassezia</i> spp.	1 (4)
Dermatite secundária a alergia alimentar	1 (4)
Dermatite secundária a lambedura psicogénica	1 (4)
Otite	3 (11)
Infecção do tracto urinário	1 (4)
Mucómetra	1 (4)
Piómetra	1 (4)
Displasia coxofemoral	1 (4)
Luxação lateral da patela	1 (4)
Hérnia perineal	1 (4)
Nódulos cutâneos	1 (4)
Epilepsia	1 (4)

### 2.3.4. Terapêutica

O tratamento etiológico, dirigido a agentes transmitidos por ixodídeos, foi realizado em 86% (24/28) da população. Os restantes quatro animais não foram sujeitos a tratamento específico por diferentes razões: em dois animais, seropositivos a *Rickettsia* spp., considerou-se não existir infecção activa; um animal morreu naturalmente, previamente ao resultado da

serologia; e o quarto animal não voltou à consulta externa, após a serologia. Relativamente aos princípios activos utilizados, foi administrada doxiciclina a onze animais (46%), doxiciclina combinada com imidocarb também a onze animais (46%), e quinolonas (enrofloxacin ou ciprofloxacina) a dois animais positivos a *Rickettsia* spp..

A dose de doxiciclina utilizada variou entre 4,2-8,3 mg/kg (mediana de 5 mg/kg), PO, BID, durante 21-28 dias (mediana de 21 dias). A dose de imidocarb variou entre 5,7-6,7 mg/kg (mediana de 6,2 mg/kg), SC, 1-3 injeções (mediana de 2 injeções) com intervalos entre injeções de 13-40 dias (mediana de 15 dias). O tempo que decorreu entre o início dos sinais clínicos e o início do tratamento etiológico ou, nos casos assintomáticos, o tempo que decorreu entre o resultado dos exames complementares e o início do tratamento etiológico, variou entre 2-240 dias, com mediana de 17 dias.

Adicionalmente, foi realizada terapia de suporte nos casos em que se considerou necessário, incluindo tratamento tópico das afecções oculares, fluidoterapia, transfusões sanguíneas, glucocorticóides, anti-inflamatórios não esteróides, entre outros, bem como terapêutica dirigida às doenças concomitantes existentes.

A resposta ao tratamento etiológico foi positiva em dez animais (42%), sendo considerada como tal nos casos em que houve remissão dos sinais clínicos ou, no que concerne aos animais assintomáticos, nos casos em que se verificou uma resolução das alterações laboratoriais. Até ao momento de realização dos inquéritos, não foram observadas recaídas nestes animais. Em dois casos (8%), não foi possível saber qual a resposta ao tratamento, pois tratavam-se de animais assintomáticos que não realizaram análises posteriores. Verificou-se uma resposta negativa nos restantes doze animais (50%), resultando em morte natural e eutanásia em três e dois casos, respectivamente. Houve uma forte suspeita que as parasitoses transmitidas por ixodídeos contribuíram para a morte natural em dois animais.

### **3. Discussão**

#### **3.1. Prevalências dos agentes etiológicos**

A população incluída neste estudo foi constituída por indivíduos que revelaram positividade a um ou mais agentes transmitidos por ixodídeos. Tal facto levou a que as prevalências obtidas fossem provavelmente mais elevadas do que as de outros estudos. Adicionalmente, tratou-se de uma população de pequena dimensão, observada durante um curto período do ano. Apesar destas limitações, pode verificar-se que a prevalência de Ac anti-*Rickettsia* spp. foi a mais elevada, tal como observado por vários autores referidos anteriormente (Bacellar et al., 1995;

Alexandre, 2005; Solano-Gallego et al., 2006a; Torina & Caracappa, 2006). As percentagens de animais seropositivos a *Rickettsia* spp. (87%), a *B. canis* (61%) e a *Ehrlichia* sp. (39%) aproximaram-se das referidas, respectivamente, por Bacellar et al. (1995), Furlanello et al. (2005), e Silveira (1992) e Torina e Caracappa (2006). A maioria da população (61%) revelou exposição a dois ou mais destes microorganismos, sugerindo uma prevalência elevada de possível co-infecção e alertando para a necessidade de realizar uma pesquisa abrangente de agentes infecciosos, aquando da suspeita clínica.

Nos animais em que o título de Ac foi quantificado, verificou-se que a presença de títulos elevados contra qualquer agente, ocorreu tanto em animais sintomáticos, como em assintomáticos. A presença de títulos baixos de Ac, em animais sintomáticos, foi difícil de avaliar para *Rickettsia* spp., devido à existência de co-infecções ou de doenças concomitantes, e para *Ehrlichia* sp., pois o título mínimo quantificado foi de 160, já por si elevado. Relativamente à exposição a *B. canis*, todos os animais com título de 20 encontravam-se assintomáticos ou com sinais clínicos atribuídos a doenças concomitantes. Contudo, é de salientar que, como a quantificação só foi realizada por um dos laboratórios, e até certa diluição, apenas é possível discutir um pequeno número de casos, sem conhecimento do título máximo de Ac em alguns deles.

O valor exacto do título de Ac torna-se indispensável quando se quer avaliar a existência de doença em fase aguda, por meio de uma segunda amostra, colhida na fase de convalescença, três semanas depois (Greene, 2006). Assim, é necessário que os laboratórios que providenciam serviços comerciais ao diagnóstico clínico, realizem titulações até à máxima diluição positiva, ou até uma diluição que permita verificar se o valor obtido é superior ao primeiro.

Nas amostras de alguns animais, foi observada a presença de fluorescência basal, podendo dever-se a reacções cruzadas ou ao período de incubação do agente pesquisado. Nestas circunstâncias, havendo suspeita clínica, deverá ser analisada uma segunda amostra, no intuito de obter confirmação do diagnóstico.

A obtenção de um resultado positivo a *E. canis* por imunomigração rápida, num animal cujo resultado por IFI foi negativo, três semanas depois, pode ser interpretada como um falso positivo ou como presença de um título abaixo do limiar de positividade para IFI. A performance deste teste rápido de diagnóstico foi avaliada por Martin (2004) em 97 amostras de soro canino, verificando-se uma sensibilidade de 73%, especificidade de 98,3%, valor preditivo positivo de 96,4% e valor preditivo negativo de 85,5%, com ocorrência de um falso positivo.

Relativamente ao resultado positivo a *Rickettsia* sp., por PCR, existem vários cenários possíveis de interpretação, uma vez que o animal em questão se apresentava assintomático, embora com alterações hematológicas e bioquímicas, que poderiam ser devidas às doenças diagnosticadas concomitantemente. Assim, é possível que fosse um caso de infecção subclínica por *Rickettsia conorii* ou outras riquetsias, ou que o resultado positivo se devesse à presença de ADN de riquetsias não viáveis.

A visualização de mórulas de *A. platys*, no esfregaço sanguíneo de um animal sintomático, demonstra a importância da realização sistemática de esfregaços sanguíneos, em todos os animais com suspeita de hemoparasitoses. A existência de reacções serológicas cruzadas entre *A. platys* e *E. canis* é baixa (Otranto et al., 2008), logo, se tivesse sido realizado uma análise por IFI para *E. canis*, provavelmente o resultado seria negativo, diminuindo a suspeita clínica. É de salientar que, neste caso, apenas foi realizada a análise microscópica, desconhecendo-se a existência de co-infecções que pudessem induzir a sobreposição de sintomas.

A necessidade da pesquisa microscópica deve ser enfatizada por várias razões. Trata-se de um método pouco dispendioso, que permite uma utilização frequente. Contudo, a baixa sensibilidade impede a sua realização como única forma de diagnóstico, devendo estar sempre aliado a outros métodos, nomeadamente à PCR ou à IFI. Dado que a emergência de hemoparasitas caninos é uma realidade, a visualização destes agentes por microscopia permite um resultado positivo, que pode passar despercebido ao realizar-se análises por IFI ou por PCR, não específicas para a espécie em questão. Adicionalmente, a utilização de IFI como método único e sem amostra de convalescença, pode levar a resultados negativos nos casos de doença aguda, originando diagnósticos errados.

Qual será então a melhor abordagem ao diagnóstico? Para *Rickettsia* spp., tendo em conta que o carácter da doença é sobretudo agudo, deve ser realizada uma análise por PCR ou uma análise de duas amostras (aguda e de convalescença) por IFI. Contudo, deve ter-se sempre em conta que um resultado positivo por PCR, na presença de sinais clínicos, não significa exclusivamente que se trata de infecção por riquetsias patogénicas, podendo existir co-infecção com outros agentes transmitidos por vectores, responsáveis pelos sinais observados. Na presença de uma sequela, potencialmente secundária a riquetsiose não tratada, pode realizar-se IFI para averiguar se houve exposição ao agente, mas sendo impossível de associar os dois eventos, principalmente em zonas endémicas. Relativamente ao diagnóstico de infecção por *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp., deverá ser realizada uma pesquisa inicial por microscopia em esfregaços de sangue de capilares periféricos e do *buffy coat*, conjuntamente com pesquisa por PCR ou por IFI. Se estiver disponível, o método de ELISA descrito por Cárdenas et al. (2007) para pesquisa de Ac anti-*E. canis*, será preferível à IFI, por apresentar

maior especificidade e sensibilidade. Se a suspeita for de infecção aguda, a amostra para PCR poderá ser de sangue periférico, mas caso o resultado seja negativo, é possível que se trate de uma infecção crónica. Nesta situação, é recomendado a análise por PCR de uma amostra de baço (Harrus et al., 2004), colhida através de punção aspirativa guiada por ultrasonografia, embora se trate de um método de diagnóstico mais invasivo e arriscado. No caso de infecções por *Babesia* spp. ou *Theileria* spp., o diagnóstico deve igualmente aliar a microscopia óptica, com PCR (infecções agudas) ou IFI. O Médico Veterinário nunca deve esquecer-se que a seropositividade a agentes transmitidos por ixodídeos, apenas significa exposição prévia ao agente, sendo necessária a comparação de duas amostras de soro para a confirmação da doença activa em fase aguda. A confirmação da doença crónica torna-se mais difícil de averiguar nas zonas endémicas, devido à existência de títulos persistentes de Ac nos animais saudáveis.

É imprescindível o desenvolvimento e a disponibilização de métodos específicos e sensíveis de diagnóstico, uma vez que o tratamento e consequente prognóstico das várias doenças referidas nesta dissertação pode depender de tal facto. Por exemplo, a proximidade geográfica dos casos de infecção canina por *T. annae*, relatados em Espanha (García, 2006), e a identificação deste parasita em gatos provenientes de Portugal (Criado-Fornelio et al., 2003b), eleva a probabilidade de existência da doença na população canina portuguesa. Seria de todo importante proceder a um estudo epidemiológico em Portugal acerca da ocorrência desta espécie em canídeos sintomáticos e assintomáticos, dada a severidade da doença provocada, o que pode levar a um falso diagnóstico de outras doenças, nomeadamente babesiose por grandes babésias ou outras causas de insuficiência renal, resultando num mau prognóstico por falta de especificidade terapêutica. Recentemente, foi desenvolvida uma técnica de PCR combinada com RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), permitindo a detecção e diferenciação de cada uma das espécies de *Babesia* e *Theileria* que infectam canídeos, com potencial para ser utilizada na prática clínica (Jefferies, Ryan & Irwin, 2007c). Foi também desenvolvida uma técnica de PCR, para a detecção de várias riquetsias do grupo exantemático, e diferenciação entre estas, através da sequenciação do produto amplificado, permitindo melhor exactidão e facilidade de diagnóstico, do que a disponível até à data (Kidd et al., 2008).

### 3.2. Caracterização da população em estudo

O sexo masculino esteve ligeiramente mais representado que o feminino, na população e para cada microorganismo. Este facto poderá não ser significativo, embora Solano-Gallego et al. (2006a; 2006b) tenham associado o sexo masculino com maior risco de infecção e seropositividade a *R. conorii*. A média de idade de 8,5 anos, havendo 96% dos animais com idade igual ou superior a quatro anos, revela uma população adulta e sénior, potencialmente com maior probabilidade de exposição prévia a ixodídeos vectores e, consequentemente, a agentes transmitidos por estes.

A proporção entre animais com raça determinada (71%) e raça indeterminada (29%) foi semelhante à verificada por Alexandre (2005). Em outros estudos, foi igualmente observada uma maioria de animais com raça determinada (Gasser et al., 2001; Furlanello et al., 2005; Siarkou et al., 2007). As raças Boxer, Cocker Spaniel e Retriever do Labrador, foram as mais representadas, provável reflexo das preferências da população portuguesa. A raça Pastor Alemão não esteve presente, apesar de ser susceptível a doença severa por *E. canis* (Mylonakis et al., 2004).

As características da pelagem podem, hipoteticamente, ter influência na frequência de contacto com ixodídeos. A existência de 54% de animais com pêlo curto, neste estudo, poderá estar relacionada com tal facto, uma vez que estes vectores se fixam preferencialmente em zonas glabras ou de pêlo raso. No entanto, os proprietários podem ter maior dificuldade em visualizar a presença de ixodídeos nos animais com pêlo médio e comprido (46%), e/ou com pelagem escura (43%). Uma percentagem considerável de animais (43%) tinha história de doenças dermatológicas, sendo interessante averiguar de futuro, até que ponto a existência de alterações cutâneas influencia ou não a fixação e atracção de ixodídeos. Por um lado, a presença de zonas de alopecia providencia áreas glabras para a fixação, mas por outro lado, a existência de lesões de hiperqueratose ou de liquenificação, poderá dificultar o processo, devido ao aumento da espessura cutânea. Outro tipo de lesões que aumentem a fragilidade da pele ou produzam certo tipo de odores, nomeadamente lesões inflamatórias ou traumáticas, poderão também facilitar a fixação e/ou a atracção dos ixodídeos.

A maioria dos animais corresponde a uma aptidão de companhia (89%), que poderá dever-se apenas a um reflexo da população canina que é levada ao Hospital Escolar. O mesmo se passa com a grande percentagem de animais com residência no distrito de Lisboa (79%) e em áreas urbanas e periurbanas (89%), dada a localização geográfica do Hospital.

A exposição a ixodídeos poderá aumentar nos animais que acompanham os proprietários para zonas campestres (54%), que têm acesso permanente ao exterior (43%) e que provêm da rua (18%). A forma como decorrem os passeios nos espaços públicos também influenciará



certamente, a frequência de contacto com ixodídeos. Nesse sentido, foi verificada uma percentagem elevada de animais com acesso a relvados e/ou descampados (92%), bem como com acesso a espaços públicos igual ou superior a três vezes por dia (68%). Adicionalmente, 64% dos animais passeiam sempre à solta, ou em alternância com passeio à trela, permitindo a exploração destes espaços de uma forma mais livre.

A existência de história recente de presença de ixodídeos, em 21% dos indivíduos, aproximou-se da reportada por Mylonakis et al. (2004) e Gasser et al. (2001). Apesar das percentagens variarem entre estudos, os valores encontrados não excedem os 43,5% verificados por Furlanello et al. (2005), indicando que o índice de suspeita clínica não deve diminuir aquando da ausência de ixodídeos durante a consulta, ou pouco antes do início dos sinais clínicos. Além da visualização dos ectoparasitas ser difícil, sem uma inspecção diária e cuidada dos animais, existe a possibilidade de ocorrência de doença crónica, cujas manifestações se verificam muito depois da fixação do ixodídeo vector.

O controlo de vectores é uma peça fulcral na prevenção das doenças transmitidas por estes, como foi referido ao longo da revisão bibliográfica. Contudo, a sua eficácia como medida preventiva, é obviamente reduzida quando não se realiza uma aplicação regular de acaricidas, ao longo de todo o ano. Este regime apenas foi realizado por 27% dos proprietários que faziam algum tipo de profilaxia acaricida. Todavia, esta percentagem aumentou para 50% após o diagnóstico, indicando uma possível sensibilização dos proprietários à problemática das doenças transmitidas por ixodídeos. Por outro lado, três proprietários deixaram de realizar o controlo de ixodídeos, após o diagnóstico. As explicações plausíveis para este acontecimento, e para a prática de uma profilaxia irregular ou sazonal, incluem: a) percepção de que a exposição do seu animal a ixodídeos é muito reduzida, logo, negligenciável; b) noção de que os ixodídeos só ocorrem na Primavera/Verão; c) esquecimento das datas de aplicação dos desparasitantes externos; d) custo relativamente elevado dos mesmos; e) confusão entre desparasitante externo e interno, com troca das datas de aplicação dos produtos.

Cabe ao Médico Veterinário o papel de informar correctamente os proprietários acerca da importância da prevenção e da forma mais correcta de a realizar.

Relativamente aos acaricidas utilizados, a maioria dos proprietários recorre a unções punctiformes de fipronil ou de permetrina/imidaclopride, ambos com elevada eficácia acaricida. Contudo, o segundo produto parece ter vantagens em relação ao primeiro, devido a maior eficácia repelente para os ixodídeos (Young et al., 2003; Hostetler et al., 2006) e maior eficácia acaricida para as formas imaturas (Otranto et al., 2005). Todavia, é importante realizar a rotação de desparasitantes, de modo a evitar o desenvolvimento de resistências.

Até à data, a imunoprofilaxia para agentes transmitidos por ixodídeos apenas está comercialmente disponível para a babesiose canina, por *Babesia canis*, e para a doença de Lyme, por *Borrelia burgdorferi*. O facto de existirem, neste estudo, apenas dois animais vacinados contra a babesiose, pode dever-se à noção que a vacina não apresenta uma eficácia desejável, sobretudo em zonas endémicas (Schetters, 2005; Bourdoiseau, 2006). O custo elevado das vacinas pode também ter contribuído para a frequência reduzida de vacinação, nos animais estudados. A ausência de seropositividade, no animal que tinha sido vacinado um mês antes da realização da IFI, poderá ter várias explicações, nomeadamente: uma diferença entre a estirpe vacinal e a estirpe utilizada na IFI; existência de exposição antiga ao agente, diminuindo a estimulação antigénica da vacina; produção baixa de Ac, devido à primovacinação incompleta.

A imunoprofilaxia para a doença de Lyme, apesar de não ser objecto de estudo da presente dissertação, foi incluída nos inquéritos realizados, de forma a comparar possíveis diferenças nos protocolos vacinais. A vacina para esta doença tem eficácia variável e não está isenta de riscos (Littman, Goldstein, Labato, Lappin & Moore, 2006). Adicionalmente, os valores de seroprevalência de 2,25% e 0,6% verificados, respectivamente, em Portugal por Alexandre (2005) e em Espanha por Solano-Gallego et al. (2006a), podem ser interpretados como relativamente baixos. Estes argumentos poderão explicar, em parte, a inexistência de animais vacinados na população estudada.

Tendo em conta que certas parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos apresentam potencial zoonótico, cabe ao Médico Veterinário informar os proprietários acerca dos riscos para a Saúde Pública, nomeadamente para crianças e idosos, representados em 43% dos agregados familiares estudados. Devem ser sublinhados os cuidados a ter aquando da remoção de ixodídeos e os comportamentos que podem aumentar a proximidade entre ixodídeos e humanos, como a ausência de controlo de vectores nos animais domésticos. Esta ausência de controlo, aliada a situações de contacto acrescido do cão com o seu dono, designadamente situações lúdicas (ocorrendo em 96% dos casos), permanência do animal no colo do dono (18%) e partilha do local de descanso (11%), poderá elevar o risco de infecção.

### **3.3. Estudo clínico**

Os sinais clínicos verificados com maior frequência na população foram sinais não específicos de inapetência (46%) e de depressão/letargia (39%). A ausência de sinais patognomónicos, nas parasitoses transmitidas por ixodídeos, dificulta o seu diagnóstico, principalmente quando os sinais clínicos presentes são reduzidos. Torna-se portanto

extremamente importante, a recolha detalhada da história pregressa e a realização de exames complementares de diagnóstico, que ajudem a suportar um possível caso de doença. A dificuldade de diagnóstico nestas situações, é acrescida quando o Médico Veterinário se depara com um único resultado de IFI positivo, sem apoio de microscopia e/ou PCR, podendo originar inúmeras interpretações. Assim, em muitas situações permanece a dúvida se este resultado se deve apenas a uma exposição antiga ao agente infeccioso, se existe efectivamente infecção activa, se esta é subclínica, ou se está em desenvolvimento um caso crónico da doença, que poderá agravar-se num futuro próximo, na ausência de tratamento.

A indisponibilidade financeira dos proprietários, que limita obviamente a quantidade de exames complementares a realizar, também contribui para o entrave a uma desejada exactidão de diagnóstico.

A dificuldade de interpretação ocorre igualmente quando, em concomitância com a parasitose, estão presentes outras doenças, originando sobreposição de sintomas. Adicionalmente, a existência de doenças concomitantes, passíveis de induzir imunossupressão, nomeadamente neoplasias (presentes em 25% da população estudada) ou leishmaniose (29%), poderá aumentar a susceptibilidade do animal à doença aguda ou facilitar o desenvolvimento de doença crónica, em animais portadores (Roura, Breitschwerdt, Lloret, Ferrer & Hegarty, 2005; Shaw & Day, 2005; Irwin, 2007).

Relativamente aos outros sinais clínicos verificados nos animais estudados, são de salientar três casos em que se verificaram certo tipo de sinais como única manifestação clínica, indicando que o índice de suspeita da presença de parasitoses transmitidas por ixodídeos, não deve diminuir nestas circunstâncias, uma vez que o tratamento específico, instaurado precocemente, pode evitar o desenvolvimento de doença severa ou sequelas. Um animal, seropositivo a *E. canis* e a *R. conorii*, apresentava exclusivamente uveíte hipertensiva unilateral. Casos de manifestações oculares, como único sinal clínico presente na EMC, foram igualmente descritos por Leiva et al. (2005) e por Komnenou et al. (2007). Outro animal, seropositivo a *Rickettsia* spp., exibia claudicação crónica do membro anterior direito, com edema e artralgia na articulação cárpica. A sintomatologia articular como única manifestação, foi também verificada na riquetsiose por *R. rickettsii* (Ettinger & Feldman, 2005). Adicionalmente, um animal que revelou positividade a *B. canis* e a *R. conorii*, e fluorescência basal a *E. canis*, apresentava um episódio de hematoquézia, tendo sido verificadas petéquias nos pavilhões auriculares e mucosa peniana, 19 dias depois. A este animal, tinha sido diagnosticada leishmaniose, nove meses antes. A co-infecção entre os vários agentes pode ter sido responsável pelas tendências hemorrágicas observadas. Embora o episódio de hematoquézia pudesse estar associado à dor demonstrada na palpação abdominal caudal e à

história de tenesmo, não foram verificadas alterações no toque rectal, na radiografia abdominal e na ultrasonografia abdominal.

Entre todos os sinais clínicos observados, a ascite surgiu como sinal atípico nestas doenças transmitidas por ixodídeos, devendo ser mencionada por ter ocorrido num animal seropositivo a *B. canis* e a *R. conorii*. Este animal apresentava igualmente inapetência e perda de peso, verificando-se um quadro compatível com nefropatia com perda de proteína, através dos exames complementares. A ascite pode ocorrer como complicação na babesiose canina, estando também descrito o desenvolvimento de glomerulonefrite membranoproliferativa nesta doença (Greene, 2006). Contudo, o animal não apresentava sinais hematológicos compatíveis com babesiose, sendo difícil de avaliar até que ponto se tratava de um caso de babesiose crónica com repercussões imunomediadas. A eutanásia deste animal impossibilitou o seguimento do caso e o diagnóstico conclusivo.

A realização de exames complementares revelou como alterações hematológicas mais frequentes: trombocitopenia (85%), eosinopenia (56%) e anemia (44%), seguidos de linfopenia (36%), neutrofilia (28%), leucocitose (24%) e monocitopenia (20%). A trombocitopenia surgiu como a anomalia hematológica mais consistente, facto verificado por vários autores nas riquetsioses, babesioses, erliquioses e anaplasmoses (Gasser et al., 2001; Mylonakis et al., 2004; Furlanello et al., 2005; Shaw & Day, 2005; Gopegui et al., 2007; Siarkou et al., 2007; Zygner et al., 2007).

A presença de uma parasitose subclínica, manifestando-se apenas por trombocitopenia moderada a severa, pode ser prejudicial em casos de doença concomitante com indicação cirúrgica, devido à hemorragia provocada durante a intervenção. Na população estudada, houve alguns animais cuja suspeita de parasitose surgiu, essencialmente, pela trombocitopenia verificada nos exames laboratoriais pré-cirúrgicos. Nestas possíveis situações de animais portadores assintomáticos, deverá ser ponderado o tratamento, afim de diminuir o risco cirúrgico.

A presença de anisocitose eritrocitária (32%), policromasia (20%) e eritrócitos nucleados (12%), sugere uma componente regenerativa da anemia em alguns animais. A visualização de linfócitos reactivos (16%), indicativo de estimulação antigénica, e de anisocitose plaquetária (8%), reflectindo uma trombopoiese activa, é também referida nestas parasitoses (Shaw & Day, 2005). É de salientar que a ocorrência de valores aumentados nos índices eritrocitários HCM e CHCM, pode dever-se a artefacto por hemólise *in vitro*, mas também pode resultar de hemólise intravascular. Este aumento foi verificado por Zygner et al. (2007), em 21% de uma população com babesiose canina. Suspeita-se que tal facto, secundário a hemólise intravascular, tenha ocorrido num dos casos aqui descritos, seropositivo a *B. canis* e a

*Rickettsia* spp.. Este animal apresentava uma anemia grave, com alterações morfológicas indicativas de regeneração, para além de valores aumentados em todos os índices eritrocitários.

Os resultados dos restantes exames complementares são mais difíceis de avaliar na população estudada, porque as determinações não foram realizadas uniformemente em todos os animais. Todavia, as alterações bioquímicas séricas verificadas com maior frequência incluíram hipalbuminémia (38%), hiperproteinémia (36%), hiperglobulinémia (57%), aumento da ureia (45%) e aumento da FAS (40%). Os resultados verificados na urianálise, conjuntamente com as imagens de ultrasonografia, são sugestivos de lesão renal em alguns animais. A piúria intensa, verificada num caso seropositivo a *R. conorii*, foi atribuída a doença concomitante. A hematúria microscópica ligeira, observada num animal, resultou provavelmente da trombocitopénia grave que este apresentava, uma vez que foram verificadas outras tendências hemorrágicas, nomeadamente petéquias nos pavilhões auriculares e mucosa peniana, e presença de sangue oculto nas fezes. As lesões focais e multifocais observadas no baço e/ou fígado de alguns animais, durante o exame ultrasonográfico, podem ter várias interpretações, uma vez que não foi realizada punção aspirativa para citologia. Os diagnósticos diferenciais destas lesões incluem, no baço: hematomas, hiperplasia nodular, neoplasia, necrose e abscessos. No fígado, os diagnósticos diferenciais incluem também quistos e granulomas, para além dos referidos nas lesões esplénicas (Nyland & Mattoon, 2002). Dois destes animais encontravam-se assintomáticos e, num deles, seropositivo a *Rickettsia* spp., foi verificada hipofibrinogenémia, achado que poderia contribuir para a formação de hematomas esplénicos multifocais.

No que concerne ao esquema terapêutico utilizado, verificou-se que a maioria dos animais aos quais foi administrada doxiciclina, realizou um tratamento com 5 mg/kg, PO, BID, durante 21 dias. Na bibliografia existente, verifica-se alguma variação nas doses e duração recomendadas, nomeadamente para o tratamento da erliquiose canina (Neer, 2002; Ettinger & Feldman, 2005; Shaw & Day, 2005). A eliminação do agente, nas fases subclínica e crónica, pode requerer um tratamento prolongado, em comparação com animais na fase aguda da doença (Harrus et. al, 2004; Schaefer et al., 2007). Este facto, aliado à potencial variação na resposta terapêutica entre animais de raças diferentes, e à dificuldade em distinguir clinicamente a fase aguda da fase crónica da doença, leva a sugerir um protocolo terapêutico com 28 dias de duração, verificado experimentalmente como eficaz (Eddlestone et al., 2007). Vários factores poderão ter contribuído para a resposta negativa ao tratamento etiológico, em 50% da população estudada, como por exemplo: a) quadro clínico apenas resultante da doença concomitante presente, ou de outra doença não diagnosticada. Nestes casos, a

seropositividade resultou provavelmente de exposição antiga ao agente transmitido por ixodídeos, ou de infecção não patogénica; b) início tardio da terapêutica etiológica, permitindo o desenvolvimento de alterações de pior prognóstico; c) co-infecção com vários agentes infecciosos; d) presença de doença concomitante, que induza imunossupressão.

Torna-se importante mencionar alguns casos que não responderam à terapêutica, por levantarem questões pertinentes. Assim, o animal que apresentava uveíte hipertensiva, seropositivo a *E. canis* e a *R. conorii*, permaneceu invisual, provavelmente pelo estado avançado das lesões e início tardio da terapêutica. Todavia, a PIO e a congestão diminuíram após o tratamento, verificando-se resolução da dor ocular. Este caso alerta para a importância da manutenção de uma suspeita clínica elevada, em casos de manifestações oculares, mesmo quando isoladas. Num estudo relativo a manifestações oculares de EMC, efectuado em 90 animais, foi verificado glaucoma secundário a uveíte crónica em 8,9% dos casos, cuja resposta ao tratamento foi igualmente fraca, verificando-se uma resposta positiva apenas em 25% dos animais, parcial em 25% e negativa em 50% (Komnenou et al., 2007).

Em relação ao animal que apresentava artrite crónica, seropositivo a *Rickettsia* spp., suspeitou-se que aquela se tratasse de uma sequela de riquetsiose, não tratada na sua fase aguda. Este tipo de sequela está descrito na riquetsiose por *R. rickettsii* (Fossum et al., 2007), provavelmente devido a artrite imunomediada não erosiva. É plausível que estas lesões ocorram noutras riquetsioses não tratadas, nomeadamente por *R. conorii*, com quadros clínicos de natureza ligeira e autolimitante. A intensificação progressiva da claudicação, leva o proprietário a dirigir-se à consulta, apenas numa fase tardia. A resposta ao tratamento etiológico é assim nula, porque o agente infeccioso já não se encontra presente, e a inflamação resulta da deposição de complexos imunes. Este caso realça a necessidade da realização de estudos que permitam um melhor conhecimento da importância de *R. conorii*, e de outras riquetsias existentes em Portugal, para o desenvolvimento de doença em canídeos, nomeadamente para a ocorrência de sequelas, quando não é instaurado um tratamento na fase aguda. Uma vez que a pesquisa serológica destas bactérias é sujeita a reacções cruzadas, e que a pesquisa por PCR é específica para o género e não para a espécie envolvida, é possível que certos casos de doença atribuída a *R. conorii*, sejam realmente devidos a outras riquetsias, actualmente consideradas como não patogénicas ou de patogenicidade desconhecida, tal como foi observado em humanos (Brouqui et al., 2004).

O animal que apresentava petéquias e outras tendências hemorrágicas, acabou por morrer 24 dias depois do início do tratamento, iniciado 19 dias após o episódio de hematoquézia. Suspeita-se que a co-infecção tenha contribuído para uma potencial situação de trombocitopenia imunomediada grave. A presença de anisocitose plaquetária e ligeira

hipercelularidade da medula óssea, indicaram que não existia mielossupressão. Adicionalmente, o animal apresentava uma linfopénia grave, hiperglobulinémia e aumento progressivo da ALT. O tratamento resultou em melhoria ligeira da trombocitopénia e da linfopénia, mas não evitou a morte, precedida por hematuria macroscópica.

A ausência de resposta ao tratamento e a morte, ocorreram também num animal, seropositivo a *Ehrlichia* sp. e a *Rickettsia* spp., que apenas apresentava como sinais clínicos inapetência e letargia ligeiras, mas tinha concomitantemente mastocitoma focal cutâneo, otite bilateral, DAPP e uma lesão nodular infectada, de carácter piogranulomatoso. A suspeita de parasitose transmitida por ixodídeos, surgiu após observação dos resultados das análises pré-cirúrgicas, que revelavam anemia, trombocitopénia, leucopénia, linfopénia, eosinopénia e monocitopénia, bem como elevação da ureia e creatinina séricas. Antes do tratamento etiológico ser iniciado, verificou-se um agravamento da anemia, leucopénia e linfopénia, com ocorrência adicional de neutropénia. O tratamento foi iniciado 13 dias após a realização das primeiras análises, e resultou em melhoria ligeira e transitória da trombocitopénia, leucopénia e linfopénia, havendo resolução da neutropénia. As alterações iniciais permaneceram no decurso do tratamento, verificando-se também hipoalbuminémia. A morte acabou por ocorrer alguns dias após o fim do tratamento, precedida por hematemese, tendo sido mencionado pelo proprietário que o animal nunca recuperou completamente o apetite. Suspeita-se de um caso de erliquiose crónica com potencial envolvimento renal e mielossupressão, apenas possíveis de confirmar com a realização de exames adicionais. A pancitopénia aproximou-se dos valores referidos por Shipov et al. (2008), como indicadores de risco para a mortalidade na EMC. A presença de doenças concomitantes nos dois últimos casos referidos, bem como o tratamento tardio, podem ter contribuído para a resposta negativa ao tratamento, alertando para a importância da suspeita clínica.

Uma vez que o tratamento etiológico precoce é fundamental para o prognóstico em todas as parasitoses referidas nesta dissertação, o Médico Veterinário deve iniciá-lo aquando de um quadro clínico-patológico compatível, mesmo antes do resultado laboratorial pelas técnicas de IFI, PCR ou microscopia, sob pena de redução da resposta terapêutica. É de salientar que as restrições financeiras de muitos proprietários impossibilitam, frequentemente, a realização de qualquer exame específico de diagnóstico, sendo importante iniciar um diagnóstico terapêutico. O proprietário deve estar ciente da potencial gravidade das parasitoses transmitidas por ixodídeos e da importância de realizar um tratamento completo, de modo a evitar a persistência do agente. Adicionalmente, deve ser realçada a necessidade da realização de análises que monitorizem a resposta ao tratamento.

### III. Conclusões

A componente prática do estágio curricular, permitiu a aquisição de competências fundamentais para o desenvolvimento futuro da actividade profissional na área Clínica, difíceis de obter de outro modo. Foi através da aprendizagem realizada, bem como do confronto com a realidade diária de um hospital veterinário, que a autora se sentiu mais confiante para desempenhar o papel de Médica Veterinária a que se propôs, no início do curso. As dificuldades sentidas possibilitaram a aplicação de um raciocínio crítico e de resolução de problemas, necessários em qualquer profissão. O contacto com os proprietários e com as condições sócio-económicas de cada um, foi fulcral para compreender a necessidade de seleccionar os métodos de diagnóstico e de tratamento, que melhor se adaptam a cada caso individual, visando a maximização do bem-estar animal. Ficou também bem patente, a noção de que a formação e a actualização contínuas, bem como a cooperação e a comunicação entre os colegas e com os donos dos animais, são a chave para o sucesso profissional.

Relativamente ao tema escolhido para a presente dissertação, várias limitações impediram a realização de um estudo clínico mais completo, entre elas: a) o período de estágio apenas possibilitou a recolha de um pequeno número de casos, que não eram exclusivamente afectados por parasitoses transmitidas por ixodídeos; b) as restrições financeiras dos proprietários levaram à ausência de realização de exames complementares, como análises bioquímicas, biópsias e necrópsias; c) o facto dos proprietários não voltarem à consulta, impediu o seguimento completo de alguns casos. Todavia, o estudo e a caracterização geral desta população permitiram a discussão de vários aspectos a ter em conta, quando se está perante um possível caso de parasitose transmitida por ixodídeos.

É importante reter que as doenças transmitidas por ixodídeos são actualmente consideradas um problema emergente. O alargamento do espectro de actividades recreativas praticadas por humanos e animais de companhia, com ocupação acrescida de espaços abertos, levou a um aumento do risco de contacto com vectores competentes e consequentemente, aumento do risco de transmissão de infecções. A crescente mobilidade dos animais de estimação, entre áreas endémicas e não endémicas, tem contribuído para uma expansão da distribuição dos agentes patogénicos, bem como dos ixodídeos que os transmitem. Adicionalmente, o aumento da abundância de hospedeiros reservatórios silváticos, como roedores e cervídeos, aliado às alterações climáticas globais, tem provocado uma grande amplificação das populações de ixodídeos, aceleração dos ciclos ecológicos dos agentes patogénicos transmitidos por estes e incidência aumentada das doenças resultantes (Genchi, 2006).



Na Europa, as parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos com maior importância, do ponto de vista clínico, são as erliquioses e as babesioses, devido ao seu potencial para induzir doença clínica severa (Shaw et al., 2001). Tal facto foi verificado na população canina estudada no Hospital Escolar da FMV. Contudo, é imperativa a avaliação do papel de outros agentes etiológicos, transmitidos por ixodídeos, nomeadamente de *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. e *Theileria* spp..

De forma a diminuir a ocorrência de doenças transmitidas por ixodídeos, a indústria farmacêutica deve continuar a investigar acaricidas e produtos com características repelentes eficazes, bem como vacinas capazes de induzir protecção adequada, contra agentes e vectores. Estes esforços preventivos devem ocorrer em conjunção com o desenvolvimento melhorado de técnicas de diagnóstico e medidas terapêuticas eficazes e seguras. Por outro lado, tem de haver uma *compliance* acrescida por parte dos proprietários no que toca ao controlo de vectores e apresentação dos seus animais à consulta ao primeiro indício de doença o que, como foi evidenciado nas doenças abordadas na presente dissertação, é fulcral para uma prevenção e prognóstico favoráveis, respectivamente.

Os médicos veterinários devem informar os seus clientes, de forma contínua e perceptível, acerca dos potenciais riscos associados a estas doenças, tanto para os animais de estimação, como para os donos, uma vez que o risco de transmissão de zoonoses é eminente.

## IV. Bibliografia

- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., López, L., Rodríguez-Franco, F., Luaces, I., Cortés, O. & Tesouro, M.A. (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 125: 365-372.
- Alexandre, N.M.L. (2005). *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 149 p.
- Allen, D.G., Dowling, P.M., Smith, D.A., Pasloske, K. & Woods, J.P. (2004). *Handbook of veterinary drugs*. (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0781741262. 1111 p.
- Arsenault, W.G. & Messick, J.B. (2005). Acute granulocytic ehrlichiosis in a Rottweiler. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 41, 323-326.
- Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A. & Filipe A.R. (1995). Antibodies against *Rickettsiaceae* in dogs of Setúbal, Portugal [abstract]. *Central European Journal of Public Health*. ISSN 1210-7778. 3(2), 100-102.
- Baneth, G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Pappalardo, B. & Ryan, J. (1998). A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 74, 133-142.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Stebbins, M., Poore, M. & Breitschwerdt, E. (2003). Serosurvey of anti*Babesia* antibodies in stray dogs and American Pitt Bull Terriers and American Staffordshire Terriers from North Carolina. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 39, 551-557.
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 124, 151-160.
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 118-125.
- Brandão, L.P., Hagiwara, M.K. & Myiashiro, S.I. (2003). Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 114, 253-265.
- Branger, S., Rolain, J.M. & Raoult, D. (2004). Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Online ISSN 1098-6596. 48(12), 4822–4828.

- Breitschwerdt, E.B. (2007a). How I treat anaplasmosis of cats, dogs, horses, mice and men [versão electrónica]. In Southern European Veterinary Conference (SEVC) and Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales (AVEPA) (Eds.), *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA, Barcelona, Spain, 2007*. Acedido em Jan. 28, 2008 em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2007/breitschwerdt2/chapter.asp?LA=1>
- Breitschwerdt, E.B. (2007b). Spotted fever group rickettsioses [versão electrónica]. In Southern European Veterinary Conference (SEVC) and Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales (AVEPA) (Eds.), *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA, Barcelona, Spain, 2007*. Acedido em Jan. 28, 2008 em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2007/breitschwerdt6/chapter.asp?LA=1>
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R.J., Bjoërsdorff, A., Blanco, J.R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P.E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, A., Furlan, S.L., Maurin, M., Oteo, J.A., Parola, P., Perez-Eid, C., Peter, O., Postic, D., Raoult, D., Tellez, A., Tselentis, Y. & Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. Online ISSN 1469-0691. 10, 1108-1132.
- Brown, G.K., Martin, A.R., Roberts, T.K. & Dunstan, R.H. (2005). Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*. ISSN 0005-0423. 83(1-2), 101-102.
- Camacho, A.T., Guitián, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Goethert, H.K., Telford III, S.R. & Spielman, A. (2004). Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. ISSN 0891-6640. 18(2), 141-146.
- Cárdenas, A.M., Doyle, C.K., Zhang, X., Nethery, K., Corstvet, R.E., Walker, D.H. & McBride, J.W. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. Online ISSN 1556-679X. 14(2), 123–128.
- Castro, M.B., Machado, R.Z., Aquino, L.P.C.T., Alessi, A.C. & Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 119, 73-86.
- Centeno-Lima, S., Rosário, V., Parreira, R., Maia, A.J., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M. & Jongejan, F. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine and International Health*. Online ISSN 1365-3156. 8(8), 760-764.
- CFSPH [Center for Food Security and Public Health]. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. (2005a). *Animal Disease Factsheets: Ehrlichiosis*. Ames, Iowa: Iowa State University. Acedido em Fev. 1, 2008, disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Disease\\_Factsheets/ehrlichiosis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/ehrlichiosis.pdf)

- CFSPH [Center for Food Security and Public Health]. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. (2005b). *Animal Disease Factsheets: Rocky Mountain spotted fever*. Ames, Iowa: Iowa State University. Acedido em Fev. 1, 2008, disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Disease\\_Factsheets/RMSF.pdf](http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/RMSF.pdf)
- Chaudhuri, S. & Varshney, J.P. (2007). Clinical management of babesiosis in dogs with homeopathic *Crotalus horridus* 200C. *Homeopathy*. ISSN 1475-4916. 96, 90-94.
- Cortese, L., Pelagalli, A., Piantedosi, D., Mastellone, V., Manco, A., Lombardi, P., Ciaramella, P. & Avallone, L. (2006). Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis* [abstract]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. Online ISSN 1439-0442. 53(10), 546-548.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R. & Irwin, P.J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome *b* genes. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 142, 238-247.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003a). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe part I: epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 113, 189-201.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003b). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. 93, 307-317.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 152, 173-185.
- Davoust, B., Marié, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. & Beugnet, F. (2003). Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 112, 91-100.
- Davoust, B., Keundjian, A., Rous, V., Maurizi, L. & Parzy, D. (2005). Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. 107, 279-283.
- Day, M.J., Mackin, A. & Littlewood, J.D. (Eds.). (2000). *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. ISBN 0-905214-39-0. p. 87.
- DGS [Direcção-Geral da Saúde]. Direcção de Serviços de Informação e Análise. Divisão de Estatística. Ministério da Saúde. (2006). Informação geral: saúde 2004. *Elementos estatísticos*. ISSN 0872-1114. p. 18.
- DGS [Direcção-Geral da Saúde]. Direcção de Serviços de Informação e Análise. Divisão de Epidemiologia. Ministério da Saúde. (2007). *Doenças de declaração obrigatória 2002-2006*. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde. p. 5, 29. Acedido em Fev. 2, 2008, disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>

- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Online ISSN 1466-5034. 51, 2145–2165.
- Eddlestone, S.M., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Gill, A., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E.B. (2006). Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. ISSN 0891-6640. 20(4), 840-844.
- Eddlestone, S.M., Diniz, P.P.V.P., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E.B. (2007). Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Online ISSN 1939-1676. 21, 1237–1242.
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2005). *Textbook of veterinary internal medicine*. (6th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders. ISBN 0-7216-0117-0. p. 631-636.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. (Eds.). (2000). *Schalm's veterinary hematology*. (5th ed.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-30692-8. p. 1058.
- Fossum, T.W., Hedlund, C.S., Johnson, A.L., Schulz, K.S., Seim, H.B., Willard, M.D., Bahr, A. & Carroll, G.L. (2007). *Small Animal Surgery*. (3rd ed.). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier. ISBN 0-323-04439-5. p. 1162.
- Fraga, E., Goicoa, A., Fraga, G., Seoane, A. & Barreiro, A. (2007). Abdominal ultrasonographic findings in 38 dogs with babesiosis (*Babesia canis canis*) [abstract] [versão electrónica]. In *14th European Association of Veterinary Diagnostic Imaging Annual Meeting 2007: Conference Guide & Abstracts Book, Porto Carras, Chalkidiki, Greece, August 29 – September 1*. p. 105-106. Acedido em Fev. 19, 2008 em: <http://www.ivis.org/proceedings/eavdi/2007/posters.pdf>
- Franc, M. & Cadiergues, M.C. (1999). Activity of a deltamethrin shampoo against *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus sanguineus* in dogs. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 81, 341-346.
- Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., Mantia, F. & Kocan, K.M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*. ISSN 1746-6148. 2(24).
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I. & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal for Parasitology*. ISSN 0020-7519. 35, 1031-1035.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G. & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 134, 77-85.

- Galvão, M.A.M., Silva, L.J., Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R. & Bacellar, F. (2005). Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Revista de Saúde Pública*. Online ISSN 1518-8787. 39(5), 850-856.
- García, A.T.C. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 97-102.
- Gasser, A.M., Birkenheuer, A.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 37, 41-48.
- Genchi, C. (2006). Ecology and epidemiology of tick-borne diseases: which role for the control?. *Parassitologia*. ISSN 0048-2951. 48, 137-138.
- Gopegui, R.R., Peñalba, B., Goicoa, A., Espada, Y., Fidalgo, L.E. & Espino, L. (2007). Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *The Veterinary Journal*. ISSN 1090-0233. 174, 129-132.
- Greene, C.E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). Philadelphia: Saunders, Elsevier. ISBN 1-4160-3600-8. 1387 p.
- Harrus, S., Alleman, A.R., Bark, H., Mahan, S.M. & Waner, T. (2002). Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. 86, 361-368.
- Harrus, S., Waner, T., Friedmann-Morvinski, D., Fishman, Z., Bark, H. & Harmelin, A. (2003). Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. ISSN 0165-2427. 96, 239-243.
- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T. & Shaw, S. (2004). Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Online ISSN 1098-6596. 48(11), 4488-4490.
- Heeb, H.L., Wilkerson, M.J., Chun, R. & Ganta, R.R. (2003). Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 39, 379-384.
- Hellmann, K., Knoppe, T., Krieger, K. & Stanneck, D. (2003). European multicenter field trial on the efficacy and safety of a topical formulation of imidacloprid and permethrin (Advantix™) in dogs naturally infested with ticks and/or fleas. *Parasitology Research*. Online ISSN 1432-1955. 90, S125-S126.
- Hellmann, K., Adler, K., Parker, L., Pfister, K., DeLay, R.L. & Rugg, D. (2007). Evaluation of the efficacy and safety of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz in dogs naturally infested with fleas and ticks in Europe. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 150, 239-245.

- Hess, P.R., English, R.V., Hegarty, B.C., Brown, G.D. & Breitschwerdt, E.B. (2006). Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. ISSN 0165-2427. 109, 117–125.
- Hostetler, J., Dryden, M.W., Payne, P.A. & Smith, V. (2006). Evaluation of an imidacloprid (8.8% w/w)-permethrin (44.0% w/w) topical spot-on and a fipronil (9.8% w/w)-(S)-methoprene (8.8% w/w) topical spot-on to repel, prevent attachment, and kill adult *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* ticks on dogs. *Veterinary Therapeutics*. ISSN 1528-3593. 7(3), 187-198.
- Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases. (2008). *ICTTD TicksBase: results for country Portugal*. Acedido em Mar. 25, 2008, disponível em: [http://www.wold.icttd.nl/php/index.php?doaction=getCountry&sel\\_country=Portugal](http://www.wold.icttd.nl/php/index.php?doaction=getCountry&sel_country=Portugal)
- Irwin, P.J. (2007). Blood, Bull Terriers and babesiosis: a review of canine babesiosis [versão electrónica]. In *Proceedings of the 32nd Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Sydney, Australia, August 19-23*. Acedido em Jan. 28, 2008 em: [http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2007/pdf/31\\_20070330002034\\_abs.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2007/pdf/31_20070330002034_abs.pdf)
- Jacobson, L.S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 126-139.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Robertson, I.D. & Irwin, P.J. (2007a). *Babesia gibsoni*: detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*. ISSN 0014-4894. 117, 115-123.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Broughton, D.K., Robertson, I.D. & Irwin, P.J. (2007b). Blood, Bull Terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*. ISSN 0005-0423. 85(11), 459-463.
- Jefferies, R., Ryan, U.M. & Irwin, P.J. (2007c). PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 144, 20-27.
- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P.V.P., Hegarty, B., Tucker, M. & Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. Article in Press. doi:10.1016/j.vetmic.2007.11.035
- Kjemtrup, A.M. & Conrad, P.A. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 112-117.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L. & Carreno, R.A. (2006). *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 103-111.

- Kommenou, A.A., Mylonakis, M.E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., Dessiris, A., Koutinas, A.F. & Ofri, R. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*. ISSN 1463-5216. 10(3), 137-142.
- Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., Mcpherson, J.T. & Maccormack, J.N. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. Online ISSN 1098-660X. 37(8), 2631-2638.
- Lehtinen, L.E., Birkenheuer, A.J., Droleskey, R.E. & Holman, P.J. (2008). In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 151, 150-157.
- Leiva, M., Naranjo, C. & Peña, M.T. (2005). Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Veterinary Ophthalmology*. Online ISSN 1463-5216. 8(6), 387-393.
- Littman, M.P., Goldstein, R.E., Labato, M.A., Lappin, M.R. & Moore, G.E. (2006). ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Online ISSN 1939-1676. 20, 422-434.
- Lobetti, R. (2004). Canine and feline babesiosis. In: *Proceedings of the 29th Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhodes, Greece, October 6-9*. Acedido em Jan. 28, 2008 em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&PID=8688&O=Generic>
- Lobetti, R. (2006). Update on the complications and management of canine babesiosis. In *Proceedings of the 31st Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Prague, Czech Republic, October 11-14*. Acedido em Jan. 28, 2008 em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture16/Lobetti3.pdf?LA=1>
- Martin, C. (2004). *Les ehrlichioses du chien: étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocyttaire*. Tese de Doutoramento. Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire – Université Claude-Bernard - Lyon I. 180 p. Acedido em Abr. 28, 2008, disponível em: [http://www2.vet-lyon.fr/bib/fondoc/th\\_sout/dl.php?file=2004lyon059.pdf](http://www2.vet-lyon.fr/bib/fondoc/th_sout/dl.php?file=2004lyon059.pdf)
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T. Romic, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 144, 242-250.
- Maurin, M., Abergel, C. & Raoult, D. (2001). DNA gyrase-mediated natural resistance to fluoroquinolones in *Ehrlichia* spp.. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Online ISSN 1098-6596. 45(7), 2098–2105.
- Mikszewski, J.S. & Vite, C.H. (2005). Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 41, 259-266.



- Moreira, S.M., Machado, R. & Passos, L.F. (2005). Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Ciência Rural*. Online ISSN 1678-4596. 35(4), 958-960.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S. & Kontos, V.S. (2004). Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Online ISSN 1547-3317. 40, 174-184.
- Ndip, L.M., Ndip, R.N., Esemu, S.N., Dickmu, V.L., Fokam, E.B., Walker, D.H. & McBride, J.W. (2005). Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. 111, 59-66.
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T. & Lappin, M.R. (2002). Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Online ISSN 1939-1676. 16, 309-315.
- Nyland, T.G. & Mattoon, J.S. (2002). *Small animal diagnostic ultrasound*. (2nd ed.). Philadelphia: Saunders. ISBN 0-7216-7788-6. 461 p.
- Otranto, D., Lia, R.P., Cantacessi, C., Galli, G., Paradies, P., Mallia, E. & Capelli, G. (2005). Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/permethrin 50% versus fipronil 10%/(S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 130, 293-304.
- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G., Stanneck, D. (2008). Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 153, 320-328.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*. Online ISSN 1098-6618. 18(4), 719-756.
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela [abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Online ISSN 1749-6632. 1078, 110-117.
- Ramsey, I.K. & Tennant, B.J. (Eds.). (2001). *Manual of canine and feline infectious diseases*. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. ISBN 0-905214-53-6. p. 76.
- Roura, X., Breitschwerdt, E., Lloret, A., Ferrer, L. & Hegarty, B. (2005). Serological evidence of exposure to *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Ehrlichia* species in healthy or *Leishmania infantum*-infected dogs from Barcelona, Spain. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. Online ISSN 1559-470X. 3(2), 129-137.
- Rugg, D., Hair, J.A., Everett, R.E., Cunningham, J.R. & Carter, L. (2007). Confirmation of the efficacy of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz for the treatment and control of fleas and ticks on dogs. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 150, 209-218.

- Schaefer, J.J., Needham, G.R., Bremer, W.G., Rikihisa, Y., Ewing, S.A. & Stich, R.W. (2007). Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Online ISSN 1098-6596. 51(9), 3394-3396.
- Schettters, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *TRENDS in Parasitology*. ISSN 1471-4922. 21(4), 179-184.
- Schettters, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., Van de Crommert, J., Krijnen, E., Moubri, K., Gorenflot, A. & Vermeulen, A.N. (2006). Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 140-146.
- Schuele, G., Barnett, S., Bapst, B., Cavaliero, T., Luempert, L., Strehlau, G., Young, D.R., Moran, C. & Junquera, P. (2008). The effect of water and shampooing on the efficacy of a pyriprole 12.5% topical solution against brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) and cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations on dogs. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 151, 300-311.
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *TRENDS in Parasitology*. ISSN 1471-4922. 17(2), 74-80.
- Shaw, S.E. & Day, M.J. (Eds.). (2005). *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. London: Manson Publishing. ISBN 1-84076-057-5. 152 p.
- Shipov, A., Klement, K., Reuveni-Tager, L., Waner, T. & Harrus, S. (2008). Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 153, 131-138.
- Siarkou, V.I., Mylonakis, M.E., Bourtzzi-Hatzopoulou, E. & Koutinas, A.F. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*. ISSN 0378-1135. 125, 304-312.
- Silva, M.M, Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*. ISSN 1646-0758. 19, 39-48.
- Silveira, C.A.P. (1992). *Ehrlichiose canina: estudo clínico de uma população animal, na região urbana e rural de Setúbal: implicações em saúde pública e saúde pública veterinária*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 110 p.
- Smith, B.E., Tompkins, M.B. & Breitschwerdt, E.B. (2004). Antinuclear antibodies can be detected in dog sera reactive to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichia canis*, or *Leishmania infantum* antigens. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. ISSN 0891-6640. 18(1), 47-51.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006a). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*. Online ISSN 1297-9716. 37, 231-244.

- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Marco, M.D., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006b). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*. ISSN 1080-6059. 12(12), 1985-1988.
- Stuenkel, S. (2007). *Anaplasma Phagocytophilum*: the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*. Online ISSN 1573-7446. 31(Suppl. 1), 79-84.
- Suzuki, K., Wakabayashi, H., Takahashi, M., Fukushima, K., Yabuki, A. & Endo, Y. (2007). A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. *Journal of Veterinary Medical Science*. Online ISSN 1347-7439. 69(5), 563-568.
- Tennant, B. (Ed.). (2005). *BSAVA small animal formulary*. (5th ed.). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. ISBN 0-905214-88-9. 332 p.
- Torina, A. & Caracappa, S. (2006). Dog tick borne diseases in Sicily. *Parassitologia*. ISSN 0048-2951. 48, 145-147.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*: a historical overview. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 3-10.
- Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H. & Rikihisa, Y. (2001). Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*. Online ISSN 1098-660X. 39(8), 2788-2793.
- Van Den Bos, R.H.C. & Curtis, R.J. (2002). The use of a 4% (w/w) deltamethrin collar (Scalibor® ProtectorBand) in the extended control of ticks on dogs. *Experimental and Applied Acarology*. Online ISSN 1572-9702. 28, 297-303.
- Varela, A.S. (2003). Tick-borne *Ehrlichiae* and *Rickettsiae* of dogs. In Bowman, D.D. (Ed.), *Companion and exotic animal parasitology*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (IVIS). Acedido em Jan. 28, 2008, disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Parasit\\_Bowman/varela/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Parasit_Bowman/varela/chapter_frm.asp?LA=1)
- Vial, H.J. & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 138, 147-160.
- Wall, R. & Shearer, D. (2001). *Veterinary ectoparasites: biology, pathology & control*. (2nd ed.). Oxford: Blackwell Science. ISBN 0-632-05618-5. p. 69, 73.
- WHO [World Health Organization]. Regional Office for Europe. (2004). *The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden on public health*. Copenhagen: World Health Organization. 144 p. Acedido em Fev. 3, 2008, disponível em: <http://www.euro.who.int/document/E82481.pdf>
- Young, D.R., Arther, R.G. & Davis, W.L. (2003). Evaluation of K9 Advantix™ vs. Frontline Plus® topical treatments to repel brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Parasitology Research*. Online ISSN 1432-1955. 90, S116-S118.


Zygner, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D. & Wedrychowicz, H. (2007). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017. 145, 146-151.

## **V. Anexos**

### **1. Assistência a apresentações de temas clínicos durante o período de estágio curricular no Hospital Escolar da FMV**

- “Tudo o que precisam de saber sobre protocolos anestésicos (mas têm medo de perguntar...)” Parte 1 – Leonor Iglésias, aluna estagiária (Outubro de 2007)
- “Tudo o que precisam de saber sobre protocolos anestésicos (mas têm medo de perguntar...)” Parte 2 – Leonor Iglésias, aluna estagiária (Outubro de 2007)
- “Vantagens da quimioterapia como complemento da cirurgia oncológica” – Dr. Gonçalo Vicente (Novembro de 2007)
- “Terapia fotodinâmica” – Dr. Joaquim Henriques (Novembro de 2007)
- “Terapêutica de arritmias” – Dr. José Matos (Dezembro de 2007)
- “Pressão arterial em pequenos animais” – Felisbela Loução, aluna estagiária (Janeiro de 2008)
- “Triagem” – Lara Pires, aluna estagiária (Janeiro de 2008)
- “Maneio clínico da epilepsia nos animais de companhia” – Ana Castro, aluna estagiária (Janeiro de 2008)
- “Princípios básicos de endoscopia” – Mariana Messias, aluna estagiária (Fevereiro de 2008)
- “Princípios básicos de ecografia abdominal: o normal e o patológico” – Maria Inês Marques, aluna estagiária (Fevereiro de 2008)
- “Urgências toxicológicas” – Ana Alves, aluna estagiária (Abril de 2008)
- “Hiperadrenocorticism: abordagem ao diagnóstico” – Rodolfo Leal, aluno estagiário (Abril de 2008)

## 2. Apresentação realizada durante o período de estágio curricular: “Transfusões sanguíneas, terapia de componentes sanguíneos e soluções transportadoras de oxigénio” (Marisa Ferreira)

 **Universidade Técnica de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Transfusões Sanguíneas**  
**Terapia de Componentes Sanguíneos**  
**Soluções Transportadoras de Oxigénio**

Novembro 2007 Marisa da Fonseca Ferreira, n.º 2002015

### Grupos Sanguíneos

- Determinados por componentes antigénicos na membrana dos GVs
- Cães
  - Sistemas DEA (Dog Erythrocyte Antigens)
    - Mais de uma dúzia descritos
  - DEA 1.1 – Sistema mais antigénico
    - Cães não tipificados apenas devem receber sangue DEA 1.1 negativo para evitar a sensibilização
    - DEA 1.1 (+) podem receber DEA 1.1 (+) ou (-)
    - DEA 1.1 (-) só podem receber DEA 1.1 (-)
  - “Dador universal”
    - Negativo para todos os Ag, excepto DEA 4 (presente em 98% dos cães); negativo para DEA 1.1, 1.2 e 7


### Grupos Sanguíneos

- Gatos
  - Sistema AB
    - Tipo A – mais frequente
    - Tipo B – menos frequente
    - Tipo AB – raro – deve receber sangue AB ou A
  - IsoAc naturais
    - Ac anti-A potentes em gatos do grupo B
      - Fortes reacções de incompatibilidade em gatos B que recebem sangue A
    - Gatos A que recebem sangue B
      - Possibilidade de reacção ligeira, normalmente subclínica
      - Descida típica do HT para níveis pré-transusão após alguns dias
    - Hemólise do recém-nascido ou Isoeritrólise neonatal
      - Gatinhos A e AB, filhos de mãe B e pai A ou AB
      - Ingestão de colostro com Ac anti-A
  - Não existem dadores universais
  - Ag Mik

### Grupos Sanguíneos - Cartões teste



[In: http://www.showcatsonline.com/x/blood\\_type\\_testing.htm](http://www.showcatsonline.com/x/blood_type_testing.htm)



[In: http://www.austintabb.com/canine-blood-type.html](http://www.austintabb.com/canine-blood-type.html)



[In: http://diamed.pionet.com/default.asp?catid=%7B98119503-610D-4669-89DB-3C2B5F2D156E%7D](http://diamed.pionet.com/default.asp?catid=%7B98119503-610D-4669-89DB-3C2B5F2D156E%7D)

### Grupos Sanguíneos

- Presença de Ac
  - Sensibilização imunológica prévia
    - Transfusão
      - Transfusões aleatórias em cães → 25-40% de sensibilização do receptor ao Ag DEA 1.1
    - Gravidez
    - Imunização
  - IsoAc naturais em gatos
- Hemólise do recém-nascido em cães
  - Fêmeas reprodutoras sensibilizadas por transfusão aleatória ou 2ª gravidez incompatível
  - Usar dadores universais
  - Tipificar a fêmea e usar machos compatíveis para reprodução

### Crossmatching – Prova Cruzada Compatibilidade Serológica

- Crossmatch Maior
  - Detecta Ac no plasma do receptor anti-GVs do dador
  - Não detecta o potencial de sensibilização
  - Indispensável em:
    - Todos os gatos – IsoAc naturais
    - Cães com Hx desconhecida, Hx de transfusão há mais de 4 dias ou cadelas previamente gestantes
- Crossmatch Menor
  - Detecta Ac no plasma do dador anti-GVs do receptor
  - Importante em:
    - Gatos – IsoAc naturais
    - Dadores potencialmente sensibilizados por transfusão prévia ou gestação
    - Quando é necessário transfundir grande quantidade de plasma
- Crossmatch de autocontrolo

Collect 0.5 mL blood in EDTA (LTT) from patient (recipient) and one or more potential donors.	
Spin blood and separate plasma from blood cells. Label tubes: Recipient RBCs; Recipient Plasma; Donor(s) RBCs; Donor(s) Plasma.	
Major cross-match: Recipient Plasma + Donor RBCs	
Minor cross-match: Donor Plasma + Recipient RBCs	
Recipient control: Recipient Plasma + Recipient RBCs	
Donor control: Donor Plasma + Donor RBCs	
Canine	Feline
Add one drop of Donor RBCs to 3 mL saline. Repeat with a second tube.	For each potential donor, prepare three microscope slides.
Add one drop of Recipient RBCs to 3 mL saline. Repeat with a second tube.	Label slides: Major cross-match; Minor cross-match; Recipient control.
Spin each tube for 15 secs at 3500 rpm. Pour off saline; add fresh saline as before; spin down; decant saline, add fresh saline and repeat until each RBC tube is washed three times. Pour off saline, leaving cells in tubes.	Place two drops of Recipient Plasma + one drop of Donor RBCs on Major cross-match slide; two drops of Donor Plasma + one drop of Recipient RBCs on Minor cross-match slide; and two drops of Recipient Plasma + one drop of Recipient RBCs on control slide.
Add two drops of Recipient Plasma to washed Donor RBCs = Major cross-match.	Mix each slide gently back and forth with rocking motion and examine for several mins, looking for hemagglutination. This should be obvious to the naked eye, and the recipient control slide should be negative.
Add two drops of Donor Plasma to washed Recipient RBCs = Recipient control.	
Add two drops of Donor Plasma to washed Donor RBCs = Donor control.	
Mix, place drop of each tube on separate microscope slides to check for agglutination or hemolysis. Both controls should be negative.	Repeat procedure for other potential donors.
In: <a href="http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2005/52.pdf">http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2005/52.pdf</a>	

## Dador ideal

- Saudável, Temperamento dócil
- Nutrição adequada
- Peso
  - Cão > 25 Kg
    - 405-495 ml sangue total
  - Gato > 3.5 Kg
    - 40-60 ml sangue total
- Idade entre 1 e 8 anos
- Se fêmea:
  - Não gestante
  - Sem gravidez prévia
  - Preferencialmente OVH
- Vacinado e desparasitado
- Não tomar qualquer medicação além dos desparasitantes
- Exame físico completo e hemograma em cada sessão
- Paine hematológico, bioquímico e serológico anual
- Tipificação sanguínea
- Colher até 25% do volume sanguíneo total
- Não ter realizado qualquer transfusão
- Sem história de doença grave
- Sem doença sistêmica
- Sem alterações de coagulação
- Não apresentar sopro cardíaco
- Sem potencial para desenvolvimento de bacteriemia
  - Doença periodontal
  - Lesões cutâneas
  - Ferimentos ou abscessos
- Sem doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue

## Dador – Doenças infecciosas

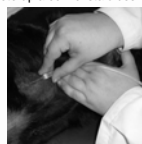
- Cães – sem proveniência de canis com más condições
  - Dirofilariose
  - Babesiose
  - Eriquiose
  - Anaplasmosse
  - Riquetsiose
  - Leishmaniose
  - Brucelose
  - Micose sistémicas
- Gatos – sem acesso à rua
  - FIV
  - FeLV
  - Toxoplasmose
  - Hemobartonelose (*Mycoplasma spp.*)
  - Dirofilariose

## Sangue total

- Contém GVs, GBs, plasma e plaquetas
  - Plaquetas ↓ após 6 h
  - Factores de coagulação ↓ após 6-48 h
- Indicações
  - Anemia hipovolémica
  - Coagulopatia
  - Choque
  - Transfusões felinas
  - Transfusões pediátricas
- Anticoagulante
  - CPDA-1 (citrato-fosfato-dextrose-adenina)
    - 35 dias de armazenamento a 4°C
  - Não utilizar heparina
    - Causa activação plaquetária no receptor devido a longo t½
    - Impossível de armazenar
- Colheita, armazenamento e transfusão em condições assépticas

## Sangue total - Colheita

- Veia jugular – tricotomia e anti-sepsia da zona
- Sentado ou em decúbito lateral
- Garrote durante todo o processo (15-20 min por gravidade, 5 min por sucção)
- Pinçar o tubo antes de retirar a agulha
  - Evitar aspiração de ar e contaminação do sangue
- Gatos
  - Sedação prévia com diazepam + quetamina ou diazepam + propofol
  - Usar cateter Butterfly 19G + torneira de três vias + 2-3 seringas 20ml com anti-coagulante (1ml CPDA-1 para 7 ml sangue)
- Repor o volume intravascular
  - Cão – forçar a ingestão de água (sopa de água com ração húmida)
  - Gato – fluidoterapia com cristalóides IV ou SC, 3 x volume de sangue retirado



## Sangue total - Administração

- Volume necessário em ml:
$$PV \text{ receptor} \times 66 (\text{gato}) \text{ ou } 88 (\text{cão}) \times \frac{HT \text{ desejado} - HT \text{ receptor}}{HT \text{ dador}}$$
- HT desejado
  - Cão: 25-30% (normal 37-55%)
  - Gato: 15-20% (normal 29-45%)
- Dose
  - 10-22 ml/kg/dia; 2 ml/kg aumentam o HT 1%
  - Começar com taxa lenta (0,25 ml/kg/h) nos primeiros 30 min para monitorizar possível reacção adversa
  - Animais normovolémicos: 5-10 ml/kg/h
  - Choque: até 22 ml/kg/h
  - Insuficiência cardíaca ou renal: 1-4 ml/kg/h
  - Velocidade baixa em jovens

## Sangue total - Administração

- Transfusão urgente → HT < 12%; Hg < 3 g/dl
- Aquecer sangue a 30-35°C durante 20-30 min
- Flushing inicial e final do cateter (16-20G) com NaCl
- Sistema de infusão com filtro
  - Eliminação de micropartículas e pequenos coágulos
- Bombas infusoras
  - Possibilidade de destruição dos GVs
  - Não usar ou contactar primeiro o fabricante
- Não administrar na via da transfusão
  - Soluções de lactato-cálcio é quelado e precipitado pelo citrato
  - Outras medicações ou aditivos
- Não exceder 4 horas de transfusão (excepção nos pacientes hipovolémicos – cardiopatia)
- Realizar HT antes, imediatamente depois e após 24h
- Monitorizar mucosas, temperatura, pulso, FR
  - Antes da transfusão
  - Cada 5-10 min, nos primeiros 15-30 min
  - Cada 15-30 min, até ao final da transfusão
  - 1 hora após o final
  - 12 horas após o final

## Riscos associados – Reacções transfusionais

	IMMUNE-MEDIATED		NON-IMMUNE	
	Immunogen	Clinical Signs	Cause	Clinical Signs
ACUTE	red cell	hemolysis, (intra or extravascular), fever	contamination	sepsis, infection
	platelets, wbc plasma proteins	anaphylaxis, hypotension, apnea, shock fever, emesis urticaria, edema, pruritus	improper collection	hemolysis, emesis
DELAYED	red cell	shortened red cell survival → 4-6 dias	volume overload	edema, dyspnea dyspnea, emesis
	platelet	neonatal hemolysis thrombocytopenia	microaggregates	tachycardia thromboembolic disease
			infected donor	disease transmission (viral, fbc, wbc parasites)

Adaptado de: <http://www.ivis.org/docarchive/proceedings/NAVCI/2006/SAE/170.pdf>

- Sinais agudos adicionais
  - Agitação
  - Arritmias
  - CID
  - Colapso
  - Diarreia
  - Fraqueza
  - Incontinência
  - Oligúria
  - Tremores
  - Vocalização

## Riscos associados – Reacções transfusionais

- Probabilidades
  - Cão: 2.5%
  - Gato: 1.2-2%
- Hemólise imunomediada
  - Aguda → típica em gatos B a receber sangue A
  - Retardada → típica em gatos A a receber sangue B ou cães com múltiplas transfusões
- Reacções não imunomediadas
  - Hemólise também por utilização de agulhas pequenas na transfusão e congelamento ou sobreaquecimento dos GVs
  - Hipocalcémia – intoxicação por citrato (tremores)
  - Hipercalemia
  - Embolismo gasoso
  - Hipervolemia especialmente em animais com doença cardíaca prévia e animais muito pequenos (gatos e cachorros)
- O que fazer em caso de reacção aguda?
  - Parar rapidamente a administração
  - Aumentar a taxa de cristalóides (caso não haja hipervolemia)
  - Administrar glucocorticóides - succinato de metilprednisolona 20-30 mg/kg IV; dexametasona 4-6 mg/kg
  - Administrar anti-histamínicos – difenidramina 2 mg/kg IV
  - Administrar adrenalina (0.01-1 mg/kg IV) se anafilaxia ou colapso não responsivos
  - Ventilação se necessário

## Auto-transfusões

- Em caso de hemorragia extensa em cavidades corporais
- Desvantagens – Risco de:
  - CID
  - Formação de trombos por GVs mortos
  - Contaminação bacteriana
  - Disseminação de células neoplásicas
  - Hemólise
- Realizar apenas se estritamente necessário

## Terapia de componentes sanguíneos

- Considerada método óptimo de transfusão no cão
- Maior rácio benefício/custo
- Mais eficaz
- Mais segura – diminui o risco de reacções adversas
- Apenas é veiculado o componente estritamente necessário
- Um dador → até 4 receptores
- Componentes estáveis (componentes plasmáticos) separados dos instáveis (GVs)
- Redução dos custos e desperdícios devido ao aumento do t½
- Diminuição do risco de hipervolemia
- Reposição mais eficaz de factores de coagulação e albumina

Produto	Componentes	Indicações	Dose	Armazenamento
<b>Concentrado de eritrócitos:</b> - Simples (HT 80%) - Em soluções aditivas (HT 55-60%) - Leucoreduzido	GVs	Anemia clinicamente sintomática  Anemia aguda – indicado quando HT < 20% Anemia crónica – indicado quando HT < 12%	- Simples: 6-10 ml/kg - Soluções aditivas: 10-15 ml/kg - Leucoreduzido: 15 ml/kg - 1 ml/kg aumenta o HT 1%	- 4°C - Simples: 21 dias - Soluções aditivas: 35-37 dias - Agitar gentilmente 2 xs / semana - Simples e leucoreduzido: resuspende em NaCl 0.9% antes da transfusão
<b>Plasma fresco congelado</b>	Plasma (albumina, globulinas, factores de coagulação, antitrombina III, antiproteases - α2-macroglobulina)	Coagulopatia, Falha na transferência passiva de Ig, CID, Sepsis, SRIS, Pancreatite aguda (controverso), Hipalbuminemia aguda reversível, (sem resposta na hipoproteinemia crónica – efica de albumina muito superior à veiculada; seria necessário 45 ml/kg para aumentar albumina em 1 g/dl)	- 6-10 ml/kg SID a TID - 10-20 ml/kg	- Entre -20°C a -30°C, até 6 horas após a colheita - Albumina viável por 5 anos - Factores de coagulação viáveis por 1 ano (2-3 meses em congelador caseiro)
<b>Plasma congelado</b>	Plasma, Níveis baixos de factores de coagulação não dependentes da vit. K	Hipoproteinemia aguda reversível, Falha na transferência passiva de Ig, Intoxicação por rodenticidas	6-10 ml/kg SID a TID	- Plasma fresco congelado com mais de 1 ano - Plasma não processado e congelado até 6 horas após a colheita - -42 dias, 4°C
<b>Crioprecipitado</b>	Factores VIII, XIII, vWF, Fibrinogénio	Deficiência em factores VIII, XIII, vWF e fibrinogénio	1 unidade / 5-15 kg	Semelhante ao plasma fresco congelado
<b>Plasma cryo-poor</b>	Factores II, IV, VII, IX, X	Intoxicação por rodenticidas	1 unidade / 10 kg	Semelhante ao plasma fresco congelado
<b>Plasma rico em plaquetas</b>	Plasma, Plaquetas	Trombocitopenia, Coagulopatia (sem resposta na trombocitopenia imunomediada – plaquetas rapidamente removidas pelo baço)	1 unidade / 3-10 kg	- Temperatura ambiente (refrigeração inactiva a função plaquetária) - Viável por 8-12 h - Agitar constantemente



## Terapia de componentes sanguíneos

### Suggested Blood Components for Treatment of Various Anemias

TYPE OF ANEMIA	OPTIMAL COMPONENT	ALTERNATE COMPONENT	ALTERNATE COMPONENT
Blood loss anemia (hypovolemic)	Packed red blood cells and crystalloid or colloid solutions	HBOC	Whole blood
Blood loss anemia (normovolemic)	Packed red blood cells	HBOC	Whole blood
Anemia of chronic renal failure	Packed red blood cells	Whole blood	HBOC
Anemia of bone marrow failure	Packed red blood cells	HBOC	Whole blood
Hemolytic anemia	Packed red blood cells	HBOC	Whole blood

HBOC, Hemoglobin based oxygen carrier.

### Suggested Blood Components for Treatment of Various Coagulopathies

TYPE OF COAGULOPATHY	OPTIMAL COMPONENT	ALTERNATE COMPONENT
Anticoagulant rodenticide intoxication	Fresh frozen plasma	Cryo-poor plasma
Disseminated intravascular coagulation	Fresh frozen plasma	
von Willebrand's disease	Cryoprecipitate	Fresh frozen plasma
Hemophilia A	Cryoprecipitate	Fresh frozen plasma
Factor VIII deficiency	Cryoprecipitate	Fresh frozen plasma
Hemophilia B	Fresh frozen plasma	
Factor IX deficiency	Fresh frozen plasma	
Liver disease coagulopathy	Fresh frozen plasma	

In: Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2004). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th ed.). Saunders.

## Artefactos originados no armazenamento

### SANGUE INTEIRO E CONCENTRADO DE GP's

Artefactos	O que é?	O que fazer?
Agregados irregulares de material branco ou esbranquiçado	Agregados de leucócitos e plaquetas	Use um sistema de infusão com filtro
Camada de material esbranquiçado a flutuar no topo do saco	Agregados de leucócitos e plaquetas	Use um sistema de infusão com filtro
Agregados brancos, regulares e bem concretizados	Possíveis colónias de bactérias	NÃO USAR ESTA UNIDADE
Hemólise visível nos tubos de análise ou nos sacos	Perda de validade ou contaminação bacteriana	NÃO USAR ESTA UNIDADE
Manchas brancas	Gordura	A gordura vai-se dissolvendo à medida que a unidade é aquecida

### PLASMA CONGELADO

Artefactos	O que é?	O que fazer?
Aspecto leitoso após descongelação	Gordura	Unidade segura para transfusão
Agregados brancos, regulares e bem concretizados	Possíveis colónias de bactérias	NÃO USAR ESTA UNIDADE

In: <http://www.hospvetporto.pt/bancodesangue/guia geral>

## Soluções transportadoras de oxigénio

- Indicações
  - Anemia
  - Choque
- Tipos
  - Baseadas em emulsão de perfluorocarbonetos
  - Baseadas em hemoglobina
- **Oxyglobin®**
  - Aprovada para utilização em cães
  - Hemoglobina bovina polimerizada ultrapurificada → 13 g/dl Hg
  - Não é necessária tipificação nem crossmatching
  - Capacidade de oxigenação superior à do sangue total
  - Penetração nos tecidos superior à do sangue total
    - Menor viscosidade
    - Menor tamanho das partículas
  - Aumento da pressão oncótica pelos polímeros
  - Capacidade de ligação ao óxido nítrico
    - Contrariando a vasodilatação generalizada em casos de sépsis

## Soluções transportadoras de oxigénio – **Oxyglobin®**

- Armazenamento a temperatura ambiente por 3 anos
- Efeitos com duração de 3 dias
- Dose total
  - Cão: 15-30 ml/kg, com taxa até 10 ml/kg/h; aconselha-se dose inicial de 10 ml/kg
  - Gato: 5-10 ml/kg, com taxa até 5 ml/kg/h (apesar de não aprovado)
- Monitorização
  - Hg total (GVs e plasma) e não HT
  - Respiração, Pressão venosa central
    - Hipervolemia, edema pulmonar e efusão pleural
- Utilização cautelosa em insuficiências ventriculares
- Após tratamento
  - Discoloração transitória das mucosas, urina, esclera e pele
    - Devido à coloração violeta escura da solução
  - Limitação de testes laboratoriais
    - Bilirrubina, enzimas hepáticas, ureia, creatinina, glucose, ionograma, tiras de urina
  - Possibilidade de vômito e sintomatologia neurológica

## Nota

- As transfusões apenas produzem resultados transitórios
- Serão necessárias mais transfusões, enquanto o paciente não conseguir compensar com produção endógena
- As transfusões diminuem a resposta fisiológica à deficiência de um componente sanguíneo
- As transfusões incompatíveis
  - Na melhor das hipóteses são clinicamente ineficientes
  - Na pior das hipóteses são fatais

## Obrigada pela atenção ☺

### **3. Inquérito realizado aos proprietários da população canina estudada**

1. Freguesia, concelho e distrito da residência
2. Idade
3. Sexo
4. Raça
5. Pelagem
  - a. Comprimento
  - b. Cor
  - c. Tipo
  - d. Anteriormente teve alguma doença dermatológica?
6. Aptidão
  - a. Companhia
  - b. Guarda
  - c. Caça
7. Proveniência do animal
  - a. Loja
  - b. Criador
  - c. Canil
  - d. Oferecido por particular
  - e. Rua – animal errante
  - f. Nascido na casa do proprietário
8. Desde quando está com o proprietário?
9. O animal costuma acompanhar os donos nos fins-de-semana ou férias?
  - a. Local para onde vai
    - i. Praia
    - ii. Campo
    - iii. Cidade
10. Onde dorme?
  - a. Cama própria?
  - b. Dos donos?
  - c. Casota/canil?
11. Há mais animais em casa?
  - a. Quais?
12. Há crianças ou idosos no agregado familiar?

13. O animal tem acesso ao exterior?
- Permanente ou intermitente?
  - Frequenta espaços públicos?
    - À trela ou solto?
    - Quantas vezes por dia?
    - Acesso a relvados ou campos abandonados?
    - Brinca com outros cães?
14. Em casa brinca com os donos? Costuma andar ao colo?
15. Antes do diagnóstico, já tinha ouvido falar destas doenças?
16. Alguém na família já teve febre da carraça?
17. Alguma vez visualizou carraças no animal?
18. História pregressa
19. Tratamento etiológico
- Resposta positiva ou negativa?
  - Recaídas?
20. Profilaxia para ectoparasitas
- Há registo de alguma reacção secundária que possa impedir o uso de insecticidas/acaricidas? Qual?
  - Profilaxia realizada antes do diagnóstico: sim ☐ não ☐  
Se sim:
    - Com que frequência?
    - Qual a forma de aplicação?
    - Qual o nome comercial/princípio activo?
  - Após o diagnóstico: sim ☐ não ☐  
Se sim:
    - Com que frequência?
    - Qual a forma de aplicação?
    - Qual o nome comercial/princípio activo?
21. Vacina contra a babesiose (*Babesia canis*): sim ☐ não ☐  
Se sim:
  - Quando realizou a primovacinação?
  - A primovacinação foi completa?
  - Fez reforços anuais?
22. Vacina contra a doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*): sim ☐ não ☐  
Se sim:
  - Quando realizou a primovacinação?
  - A primovacinação foi completa?
  - Fez reforços anuais?
23. Doenças concomitantes: sim ☐ não ☐  
Se sim:
  - Quais?
  - Quando surgiram?